Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr.Dr. h.c. J. Boch

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

UNTERSUCHUNGEN ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN DARSTELLUNG DES NAIROBI SHEEP DISEASE–VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Christian Krolopp

aus
München

München 1981

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr.Dr. h.c. J. Boch

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

UNTERSUCHUNGEN ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN DARSTELLUNG DES NAIROBI SHEEP DISEASE–VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Christian Krolopp

aus
München

München 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. E. Munz
Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 27.Februar

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1.	Überblick über die Familie der Bunyaviridae und die bunyavirusähnlichen Virusarten	2
2.1.1.	Allgemeine Gesichtspunkte	2
2.1.2.	Überblick über die Nomenklatur der Bunyaviren	3
2.1.3.	Allgemeines zur Morphologie der Bunyaviren	9
2.1.3.1.	Morphologische Kennzeichen	12
2.1.3.2.	Kennzeichen der Virusvermehrung und Morphogenese	12
2.1.4.	Molekularbiologische, physikalische und chemische Eigenschaften der Bunyaviren	13
2.2.	Die Nairobi Sheep Disease (NSD) - Serogruppe	14
2.2.1.	Vektoren, Wirte und Verbreitungsgebiete der Viren der NSD-Gruppe	14
2.2.1.1.	Dugbe-Virus	14
2.2.1.2.	Ganjam-Virus	14
2.2.1.3.	NSD-Virus	15
2.2.2.	Erkrankungen durch Viren der NSD-Gruppe	15
2.2.2.1.	Dugbe- und Ganjam-Virus-Infektion	15
2.2.2.2.	NSD-Virus-Infektion	16
2.2.3.	Serologische Beziehungen	16

Seite

3.2.3.3.2. Elektronenoptische Befunde nach Sedimentation von NSDV in einem 5 - 20 %-igen Saccharosedichtegradienten 38

3.2.4. Immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen 39

3.2.5. Polyäthylenglykol-Präzipitation 39

3.2.6. Glutaraldehydfixation 39

3.2.7. Elektronenmikroskop-Objektträger 40

3.2.8. Negativkontrastierung 40

3.2.9. Zusammenfassende Beschreibung der Morphologie der im negative staining dargestellten NSDV-Partikel 41

3.2.10. Ultrahistologische Untersuchung der mit NSDV infizierten Zellen 42

3.2.11. Abbildungen 44

4. Besprechung der Ergebnisse 54

5. Zusammenfassung 61

Summary 63

6. Literaturverzeichnis 65

7. Lebenslauf 71

1. EINLEITUNG

Das Nairobi Sheep Disease-Virus (NSDV) ist ein durch bestimmte Zeckenarten in Afrika übertragener Erreger, der bei Schafen und Ziegen eine gefährliche Erkrankung verursachen kann.

Der biologische Übertragungsmodus charakterisiert das NSDV als ein Arbovirus. Seine serologischen Beziehungen zu anderen durch Zecken und Stechmücken übertragenen Arboviren sowie bestimmte biochemische und biophysikalische Eigenschaften haben dazu geführt, das NSDV zusammen mit dem Ganjam- und dem Dugbe-Virus als eine Gruppe der "bunyavirusähnlichen Viren" in der internationalen Virusnomenklatur zu führen.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Morphologie des NSDV, die aus Untersuchungen von Ultradünnschnitten gewonnen worden waren, bestätigten diese Zuordnung noch nicht eindeutig. Ziel vorliegender Arbeit war es deshalb zu versuchen, die Morphologie freier NSDV-Virionen elektronenoptisch darzustellen, um damit weitere Beweise für seine Klassifikation bzw. die Einordnung in die taxonomische Gruppe der bunyavirusähnlichen Viren zu erhalten.

Seite

2.2.4. Morphologie der zur NSD-Serogruppe gehörenden Erreger 17

2.2.4.1. Dugbe- und Ganjam-Virus 17

2.2.4.2. NSD-Virus 17

3. Eigene Untersuchungen 19

3.1. Material und Methoden 19

3.1.1. Abkürzungen 19

3.1.2. NSD-Virusstämme 20

3.1.3. Zellkulturen 20

3.1.3.1. Schafnierenzellen 20

3.1.3.2. Babyhamsternierenzellinie BHK 13 21

3.1.3.3. Rattenastrozytenzellinie C_6 21

3.1.4. Kulturgefäße 21

3.1.5. Versuchstiere (Mäuse) 22

3.1.6. Züchtung des NSD-Virus in Zellkulturen 22

3.1.7. Titration von Virusmaterial 23

3.1.8. Virusgewinnung aus Saugmäusen 23

3.1.9. Ultrazentrifugationsmethoden 24

3.1.9.1. Airfuge-Ultrazentrifugation 24

3.1.9.1.1. Präparationstechnik 24

3.1.9.1.2. Testläufe der Airfuge mit verschiedenen Virusspezies unter variierten Zentrifugationsbedingungen 25

3.1.9.1.3. Sedimentation von NSDV-Material 25

3.1.9.2. Konzentrierung von Virusmaterial mit der Ultrazentrifuge L2 - 65 B (Fa. Beckman Instruments) 26

		Seite
3.1.9.3.	Dichtegradientenzentrifugationsversuche (Ultrazentrifuge L2 - 65 B)	26
3.1.9.3.1.	Fraktionierung von Virussuspensionen	26
3.1.9.3.2.	Sedimentierung von NSDV durch einen 5 - 20 %-igen Saccharosegradienten	27
3.1.10.	Immunoelektronenmikroskopische Versuche	29
3.1.11.	Präzipitation mit Polyäthylenglykol	30
3.1.12.	Glutaraldehydfixation	31
3.1.13.	Elektronenmikroskop-Objektträger	31
3.1.14.	Beschicken der Netze mittels der Adsorptionsmethode	31
3.1.15	Negativkontrastierung	32
3.1.16.	Ultrahistologische Untersuchung von NSDV-infizierten Zellen	33
3.1.17.	Elektronenmikroskop	34
3.2.	Ergebnisse	35
3.2.1.	Züchtung von NSDV	35
3.2.2.	Titration von Virusmaterial	35
3.2.3.	Ultrazentrifugationsmethoden	36
3.2.3.1.	Airfuge-Ultrazentrifugation	36
3.2.3.1.1.	Testläufe	36
3.2.3.1.2.	Sedimentation von NSDV-Material	37
3.2.3.2.	Konzentrierung von Virusmaterial mit der Ultrazentrifuge L2 - 65 B	37
3.2.3.3.	Dichtegradientenzentrifugationsversuche (Ultrazentrifuge L2 - 65 B)	38
3.2.3.3.1.	Fraktionierung von Virussuspensionen	38

2. SCHRIFTTUM

2.1. Überblick über die Familie der Bunyaviridae und die bunyavirusähnlichen Virusarten

2.1.1. Allgemeine Gesichtspunkte

Die Gruppe der Arboviren bildet keine geschlossene taxonomische Einheit, ihr gemeinsamer Parameter ist vielmehr ein spezieller biologischer Infektionsmodus. Die Übertragung erfolgt nämlich in der Regel durch blutsaugende Arthropoden auf Vertebraten.

Dieses gemeinsame biologische Merkmal sagt jedoch nichts über die Einordnung von Arboviren in die Virusnomenklatur aus. Wie alle Virusarten kann man auch die Arboviren aufgrund ihrer biochemischen, biologischen, serologischen und morphologischen Eigenschaften verschiedenen Virusfamilien und Genera zuordnen. Entsprechend diesen modernen taxonomischen Kriterien hat man die bisher bekannten Arboviren den folgenden Familien bzw. Genera zugerechnet: Iridoviridae, Reoviridae (Genus Orbivirus), Togaviridae (Genera Alpha- und Flavivirus), Rhabdoviridae (Genus Rhabdovirus), Bunyaviridae und schließlich zu den noch nicht näher klassifizierten "bunyavirusähnlichen Viren".

Einen Überblick über die Zugehörigkeit zu den einzelnen Familien und die wesentlichen Eigenschaften einiger medizinisch bzw. veterinärmedizinisch bedeutsamer Arboviren vermittelt Tabelle 1.

Die Zahl der Arbovirusarten stieg in den letzten 20 Jahren sprunghaft an. Derzeit sind etwa dreihundert verschiedene Spezies bekannt, die man mit Sicherheit den Arboviren zurechnen kann. Bei einer Reihe von isolierten Agentien stehen noch Beweise für ein entsprechendes biologisches Verhalten aus. Die meisten Arboviren wurden früher entsprechend ihres serologischen Verhaltens in die

Arbovirusgruppen A, B und C eingeordnet. In der 1964 aufgestellten Gruppe der Bunyaviren findet man nur relativ wenige Erreger mit besonderer medizinischer Bedeutung, obwohl, wie sich herausstellte, diese die meisten Arboviren umschließt.

2.1.2. Überblick über die Nomenklatur der Bunyaviren

Das Präfix "Bunya-" leitet sich von dem Ortsnamen Bunyamwera (Distrikt Bwamba, Uganda) ab. Dort wurde im Jahre 1943 aus Aedes aegypti ein Virus isoliert, das nachfolgend als Bunyamweravirus bezeichnet wurde.

Die Klassifizierung in die Arbovirusgruppen A, B und C und die Nomenklatur der von Arthropoden, Wirbeltieren und Menschen isolierten Virusarten wurden in den 50er Jahren hauptsächlich nach ihrem Verhalten im Neutralisationstest (NT), in der Komplementbindungsreaktion (KBR) und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Hämagglutination bestimmter Erythrozyten und des Nachweises entsprechender Antikörper im Hämagglutinationshemmungstest (HAH) vorgenommen. Die in der Arbovirusgruppe C (CASALS und WHITMAN, 1961) zusammengefaßten Virusarten bilden heute eine Untergruppe der Familie Bunyaviridae. Diese Familie und die Viren, die bis jetzt als "bunyavirusähnlich" bezeichnet werden, da ihre Zugehörigkeit noch nicht endgültig nach allen Bestimmungskriterien bewiesen werden konnte, umfassen derzeit 209 Spezies, die manchmal mit dem Sammelbegriff "Bunyaviren" angesprochen werden. Innerhalb der Familie Bunyaviridae hat man bisher nur ein Genus definiert; es wurde "Bunyavirus" genannt. Synonym wird auch oft die Bezeichnung "Bunyavirussupergruppe" für dieses 114 Spezies umfassende Genus gebracht, weil serologische Beziehungen zwischen einzelnen Mitgliedern der in dieser Supergruppe enthaltenen 13 Serogruppen bestehen. Innerhalb der einzelnen Serogruppen sind die Spezies mehr oder weniger eng verwandt. Dies kommt in gleichartigem oder

unterschiedlichem Verhalten im HAH und NT zum Ausdruck, während die KBR überwiegend zur Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit benutzt wird. Eine weitere Unterteilung der Familie Bunyaviridae gemäß eines vom "Subcommittee on interrelationships among catalogued arboviruses" vorgeschlagenen Systems umfaßt sogenannte Komplexe, Virusspezies bzw. Serotypen, ferner Subtypen und Varietäten. Die Differenzierungen beruhen auf dem jeweiligen serologischen Verwandtschaftsgrad bzw. auf genetischen Unterschieden (BERGE, 1975; BISHOP und SHOPE, 1979). Dieses Klassifikationsschema findet in gleicher Weise auch bei den bunyavirusähnlichen Viren Anwendung, von denen jedoch viele bisher nur nach morphologischen Kriterien beurteilt und eingeordnet werden konnten.

Mindestens 95 weitere, in dem bisher beschriebenen System nicht aufgeführte Arboviren werden heute als "andere mögliche Mitglieder" der Bunyaviridae angesehen bzw. als "Bunyaviruslike Viruses" bezeichnet (PORTERFIELD et al., 1975, 1976; MATTHEWS, 1979). Sie sind in 11 Serogruppen zusammengefaßt.

Das Verbreitungsgebiet der Bunyaviren ist global. Die einzelnen Mitglieder hat man auf allen Kontinenten der Erde (mit Ausnahme der Antarktis) nachgewiesen.
Gliederung und Unterteilung der Familie Bunyaviridae und der bunyavirusähnlichen Viren zeigen die Tabellen 2 und 3.

Tab. 1 Einteilung der Arboviren mit medizinisch und veterinärmedizinisch wichtigen Vertretern

FAMILIE (Genus) Vertreter	Hülle	Kapsid-symmetrie	Ort der Kapsid-zusammensetzung	Ort der Kapsid-umhüllung	Ätherresis-tenz	Kapsomeren	Virion-durchmes-ser / Form
			D N S - Viren				
IRIDOVIRIDAE Afrik. Schweine-pest-Virus (V.)	ja	kubisch	Zytoplasma	Zytoplasmat. Membranen	labil	1500	130 nm/ Ikosaeder
			R N S - Viren				
REOVIRIDAE (Orbivirus) Blue tongue-V. Colorado-tick-fever-V.	nein	kubisch	Zytoplasma	————	stabil	92	75 nm/ Ikosaeder
TOGAVIRIDAE (Alphavirus) Western-, Eastern-, Vene-zuelan-Equine-Encephalitis-V. Semliki-Forest-V.	ja	kubisch	Zytoplasma	Oberfl. Mem-branen	labil	32 o. 42	40 - 60 nm/ Ikosaeder

Tab. 1 (Forts.)

FAMILIE (Genus) Vertreter	Hülle	Kapsid-symmetrie	Ort der Kapsid-zusammensetzung	Ort der Kapsid-umhüllung	Ätherresistenz	Kapsomeren	Virion-durchmesser / Form
(Flavivirus) Gelbfieber-V. Zentr.-Europ.-Zeckenencephalitis-V. Japan. Encephalitis-V. Louping-ill-V. Dengue-V., Typ 1, 2, 3, 4	ja	kubisch	Zytoplasma	Intrazytopl. Membranen	labil	?	40 - 60 nm/ Ikosaeder
RHABDOVIRIDAE (Rhabdovirus) Stomatitis vesic.-V.	ja	helikal	Zytoplasma	Zellmembran	labil	?	65 x 180 nm/ Projektilform
BUNYAVIRIDAE und BUNYAVIRUSÄHNLICHE VIREN (Bunyavirus und noch nicht definierte Genera) Nairobi Sheep Disease-V. Rift Valley fever-V. Akabane-V.	ja	helikal	Zytoplasma	Intrazytopl. Membranen	labil	?	100 nm/ sphärisch

(Tab. modifiziert nach PORTERFIELD, 1975 und MELNICK, 1979)

Tab. 2

FAMILIE BUNYAVIRIDAE

GENUS BUNYAVIRUS, 13 Serogruppen, 114 Virusspezies

Gruppe:	Anopheles A	Bunyamwera	Bwamba	Gruppe C	California	Capim	Guama
Vertreter: (Beispiele)	Lukuni	Bunyamwera Wyeomyia	Bwamba	Carapura	Cal. encepha- litis Tahyna	Capim	Guama Bimiti Catu
Gruppe:	Koongol	Mirim	Olivantsvlei	Patois	Simbu	Tete	
Vertreter:	Koongol	Mirim	Botambi	Zegla	Akabane Oropouche	Tete	

Nicht eingruppierte Spezies:
Gamboa
Guaratuba
Jurona
Kaeng Khoi

Tab. 3 ANDERE MÖGLICHE MITGLIEDER DER BUNYAVIRIDAE oder auch "BUNYAVIRUSÄHNLICHE VIREN"

Bildung weiterer Genera der Bunyaviridae möglich, 11 Serogruppen, 95 Spezies

Gruppe:	Anopheles B	Bakau	Crimean-hemorrhagic-fever-Congo		Kaisoidi	Mapputa
Vertreter: (Beispiele)	Boraceia	Bakau Ketapang	Semunya Hazara Ib Ar 10.200		Kaisoidi Lanjan	Maprik
Gruppe:	Nairobi Sheep Disease	Phlebotomus fever	Thogoto	Turlock	Uukuniemi	Sakhalin
Vertreter: (Beispiele)	Nairobi Sheep Disease	Candiru	Thogoto	Turlock	Uukuniemi	Sakhalin
	Dugbe	Karimabad			Manawa	Taggert
	Ganjam					

Nicht eingruppierte Spezies: Rift Valley fever, Bhanja, Lone Star, Witwatersrand u.a.

(Tab. 2 und 3 modifiziert nach BISHOP und SHOPE, 1979; MATTHEWS, 1979)

2.1.3. Allgemeines zur Morphologie der Bunyaviren

Die Klassifizierung dieser Viren basiert größtenteils auf ihrem serologischen Verhalten und auf gemeinsamen molekularbiologischen und physikalischen Eigenschaften. Nur bei relativ wenigen Mitgliedern der Familie der Bunyaviridae und der bunyavirusähnlichen Viren sind bisher morphologische Untersuchungen gemacht worden.

Zwei generell verschiedene Methoden zur elektronenoptischen Darstellung der Viruspartikel wurden angewendet. Die Untersuchung von Ultradünnschnitten infizierter Zellkulturen oder von Geweben infizierter Versuchstiere erlaubte auch Aussagen über den intrazellulären Ort der Virusvermehrung und die Vorgänge der Morphogenese. Mit dem sogenannten "negative staining" - Verfahren konnten andererseits die Strukturen freier, isolierter Partikel dargestellt werden. Das Studium der einschlägigen Literatur zeigt jedoch, daß die Mehrzahl der Erkenntnisse durch Untersuchungen von Ultradünnschnitten infizierter Zellen bzw. Geweben gewonnen wurden, wobei bisher überwiegend Viren der California encephalitis-Gruppe und der Bunyamwera-Gruppe Berücksichtigung fanden.

MURPHY, HARRISON und WHITFIELD (1973) beschrieben anhand von Ultradünnschnittpräparaten von Gehirnen und Lebern infizierter Saugmäuse die intrazellulär zu beobachtenden Charakteristika verschiedener Bunyaviren. Sie untersuchten so das Bunyamweravirus (Serogruppe Bunyamwera), einige Vertreter der Serogruppe C, der Guama-, Capim-, Simbu- und der Patois-Serogruppe. Die Autoren machten ferner Angaben über die Morphologie einiger Spezies der bunyavirusähnlichen Viren, unter anderem auch über die des Ganjam-Virus, eines Mitgliedes der Nairobi Sheep Disease-Serogruppe. Alle diese Erreger stellten sich elektronenoptisch gleich dar, eine Unterscheidung nach spezifischen morphologischen Eigenschaften ist deshalb nicht möglich.

Die Virionen erwiesen sich als runde, ovale, seltener längliche Gebilde. Sie besaßen mittlere Durchmesser von ca. 100 nm. Interzellulär gelegen zeigten die Partikel auf einer äußeren membranähnlichen Schicht einen bürstenartigen Besatz von Projektionen, der bei intrazellulären Virionen weniger zur Darstellung kam. Die Innenstruktur der Partikel stellte sich elektronenoptisch unterschiedlich dicht dar. Sie erschien in manchen Fällen vollständig homogen, besaß andererseits auch des öfteren ein granuliertes oder filamentöses Aussehen. Budding-Prozesse in die Vakuolen des Golgiapparates, in denen die Viruspartikel angehäuft beobachtet wurden, konnten als Teil der intrazytoplasmatischen Virusreifung regelmäßig beobachtet werden.

Den Erreger des Krim'schen Haemorrhagischen Fiebers, dessen Serogruppe mit der NSD-Serogruppe verwandt ist, untersuchten KEROLEV et al. (1976). Sie beschrieben runde bis ovale, ungefähr 85 - 95 nm große Gebilde in Ultradünnschnitten von Gehirnen infizierter Saugmäuse. In den Zellen waren, analog zu den Ergebnissen von MURPHY, HARRISON und WHITFIELD (1973) Ausweitungen und Proliferationen von Golgisacculi und -vesikeln zu beobachten, die Viruspartikel enthielten. Das "core" der Virionen erschien elektronenoptisch meist hell, besaß manchmal jedoch ein dunkleres Zentrum. Waren die Partikel in Ultradünnschnitten tangential angeschnitten, zeigten sie sich außen wie mit faserartigen Gebilden von 9 - 10 nm Länge besetzt. Der Unterschied von intra- zu extrazellulärem Virus bestand in der größeren elektronenoptischen Dichte und einem besser sichtbar ausgebildeten Umriß der freien Partikel. In der Zelle bildeten die Virionen teilweise einen Verband von kristallähnlicher Struktur.

Ähnliche Befunde konnten DAVID-WEST und PORTERFIELD (1974) bei der Untersuchung des Dugbevirus, das serologisch der NSD-Gruppe

angehört, erheben. Sie fanden in infizierten Schweinenierenzellen eine große Anzahl Virionen, deren Durchmesser 90 - 100 nm betrug. Das "core" besaß eine fibrilläre Struktur. Die Partikel waren von einer dreischichtigen Membran umgeben, deren Oberfläche mit "spikes" oder "knobs" besetzt war.

BERGOLD et al. (1969) untersuchten mit dem "negative staining"-Verfahren die Morphologie des Oropouche- (Simbu-Serogruppe), Bimiti-, Catu- und des Guama-Virus (alle Guama-Serogruppe). Die Durchmesser der Partikel lagen hier bei ca. 50 nm. Die Virionen besaßen eine annähernd runde Gestalt und waren von einer membranartigen Hülle umgeben, die beim Catu- und beim Guama-Virus mit filamentösen Projektionen besetzt erschien.

Mit der elektronenmikroskopischen Darstellung durch "negative staining" des Karimabad-Virus (Phlebotomus fever - Serogruppe) konnten ROBESON et al. (1979) ebenfalls die morphologischen Merkmale der Bunyaviren aufzeigen. Die Karimabad-Virionen besaßen eine Größe von 100 $\pm$ 10 nm. Meist waren sie von runder, des öfteren auch von polymorpher Gestalt. Die äußere Begrenzung der Partikel bestand aus einem 10 nm breiten Ring aus Projektionen, die auf einer elektronenoptisch hellen Hülle saßen.

Unter den mit Negativ-Kontrastierung dargestellten Bunyaviren nimmt das Uukuniemivirus eine Sonderstellung ein. Zwar gleicht dieser Erreger in Größe und Form weitgehend den anderen Bunyaviren. BONSDORFF und PETTERSON (1975) gelang es hier jedoch, mit Hilfe einer Glutaraldehydfixation besondere Oberflächenstrukturen deutlich zu machen. Dabei zeigten sich nach "negative staining" mit Uranylacetat hexagonal angeordnete Oberflächenkomponenten in Form hohler Zylinder von 8 - 10 nm Länge und 10 - 12 nm im Durchmesser. Diese Projektionen sind in kubischer Symmetrie angeordnet, d.h. das Uukuniemivirion besitzt die äußere Form eines Ikosaeders.

Insgesamt wurde die Morphologie von bisher ca. 50 verschiedenen Vertretern des Genus Bunyavirus und der bunyavirusähnlichen Viren untersucht. Eine synoptische Betrachtung der Ergebnisse läßt folgendes Bild der Morphologie und der Morphogenese der Bunyaviren erkennen:

2.1.3.1. Morphologische Kennzeichen

Die Virionen sind in der Regel von sphärischer Gestalt, erscheinen manchmal jedoch polymorph. Ihr mittlerer Durchmesser liegt zwischen 80 und 120 nm. Darüberhinaus werden seltener gestreckte, längliche Partikel beschrieben, über deren Bedeutung man sich noch nicht im klaren ist, die aber häufig als präparationsbedingt angesehen werden.

Zellgebundene und extrazelluläre Partikel besitzen die gleiche Größe.

Die Virushülle wird offensichtlich von einer Lipiddoppelschicht gebildet, auf der Projektionen von ungefähr 5 - 10 nm Länge sitzen.

Die Bunyaviren gleichen sich weitgehend in ihren inneren Strukturen. Diese stellen sich als homogene bis feinfibrilläre Massen dar, die entweder gleichmäßig oder aber mehr zentral bzw. mehr marginal verteilt sind.

2.1.3.2. Kennzeichen der Virusvermehrung und Morphogenese

Ort der Virusvermehrung ist das Zytoplasma. Dabei sind besonders die glatten endoplasmatischen Membranen und der Golgiapparat in den Reifungsprozess mit einbezogen. Dort konnten sowohl "Budding-Prozesse" als auch größere Ansammlungen von Viruspartikeln festgestellt werden.

Die Virusfreisetzung scheint auf verschiedenen Wegen möglich zu sein: Ein Transport reifer Partikel durch zytoplasmatische Organellenzysternen ist gleichermaßen möglich wie die Freisetzung durch Zusammenhangstrennung der Zellmembran mit Austritt von Zellinhalt.

2.1.4. Molekularbiologische, physikalische und chemische Eigenschaften der Bunyaviren

Bunyaviren sind zwar wegen sehr unterschiedlicher serologischer Beziehungen vielfältig klassifiziert, doch verbindet sie neben einer ähnlichen Morphologie eine Reihe wichtiger gemeinsamer molekularbiologischer, physikalischer und chemischer Eigenschaften. Sie lassen sich nach BISHOP und SHOPE (1979) wie folgt zusammenfassen:

Bunyaviren besitzen als Nukleinsäure RNS

Ihr Genom ist einsträngig, negativ und in drei Segmente geteilt, welche die Bezeichnung L, M und S tragen (für large, medium und small). Das Molekulargewicht des Genoms liegt zwischen 4 - 6 x 10^6 Dalton

Diese drei Segmente sind jeweils mit Proteinen verbunden. Sie bilden so drei Nucleocapside von zirkulärer Gestalt und helikaler Symmetrie. Ein bestimmtes, offensichtlich bei allen Bunyaviren vorkommendes Nucleocapsidprotein hat man mit dem Buchstaben N belegt, ein weiteres, nicht in allen Fällen nachzuweisendes mit dem Buchstaben L

Auf der äußeren Virusoberfläche befinden sich zwei virusspezifische Glykoproteine, die mit G_1 und G_2 bezeichnet wurden

Die Dichte der Bunyaviren beträgt 1,17 - 1,19 g/cm³ (in Saccharose)

Die Sedimentationskoeffizienten liegen zwischen 350 und 470 $S_{(20/W)}$

Bunyaviren sind labil gegenüber Äther, Chloroform und Aceton

2.2. Die Nairobi Sheep Disease - Serogruppe

2.2.1. Vektoren, Wirte und Verbreitungsgebiete der Viren der NSD-Gruppe

2.2.1.1. Dugbe-Virus

Der Erreger ließ sich aus Amblyomma variegatum (CAUSEY et al., 1971), aus anderen Zeckenarten sowie aus Culicoides und Aedes aegypti isolieren (BERGE, SHOPE und WORK, 1970; BERGE, 1975; CONVERSE et al., 1974).

Als gesicherte Wirte sind der Mensch, ferner Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine und Ratten anzusehen, wie durch Antikörpernachweis und Virusisolierung festgestellt werden konnte (BERGE, SHOPE und WORK, 1970; KEMP, CAUSEY und CAUSEY, 1971).

Die Fundorte des Erregers liegen in Kamerun, Nigeria und zentralafrikanischen Gebieten.

2.2.1.2. Ganjam-Virus

Der Erreger wurde aus Haemaphysalis wellingtoni, aus Culex-Mücken und aus menschlichem Serum in Indien isoliert (BOSHNELL et al., 1970; CASALS, 1968; DANDAWATE und SHAH, 1969; BERGE, 1975; RAJAGOPALAN, SREENIVASAN und SHARDA, 1970).

2.2.1.3. NSD-Virus

Wichtigster natürlicher Überträger ist die braune Ohrzecke Rhipicephalus appendiculatus (MONTGOMERY, 1917); eine transovarielle Übertragung des Virus von einer Zeckengeneration zur nächsten gilt wie bei R. pulchellus als gesichert. Amblyomma variegatum kann den Erreger ebenfalls weiterverbreiten. Wahrscheinlich kommen darüber hinaus auch noch andere Spezies von Rhipicephalus, Amblyomma und Hyalomma als Vektoren in Frage (DAUBNEY und HUDSON, 1931, 1934; EDELSTEIN, 1975; LEWIS, 1949).

Natürlicherweise sind alle Schaf- und Ziegenrassen für das NSD-Virus empfänglich, wenn auch afrikanische Schafrassen heftiger erkranken als europäische. Eine Infektion von Schopfduckern (Cephalophus caerulus) ist beschrieben worden.

Als Versuchstiere eignen sich weiße Mäuse, insbesondere solche im Alter bis zu 4 Tagen (TERPSTRA, 1969; ANSELL, 1957; WEINBREN et al., 1958).

Durch den Nachweis von Antikörpern in kleinen Wiederkäuern wurden folgende Verbreitungsgebiete der NSD ermittelt: Kenia, Uganda, Botswana, die Kalahari, Zaire, Mozambique, Republik Südafrika, Somalia und Äthiopien (TERPSTRA, 1969; TAYLOR, 1967 zit. bei KIRYA et al., 1972; DAVIES, 1972).

2.2.2. Erkrankungen durch Viren der NSD-Gruppe

2.2.2.1. Dugbe- und Ganjam-Virus-Infektion

Beide Virusarten verursachen beim Menschen eine fieberhafte Erkrankung, Kopf- und Gliederschmerzen mit Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens (KURSTAK und KURSTAK, 1977).

2.2.2.2. NSD-Virus-Infektion

Bei Schafen und Ziegen wird eine fieberhafte hämorrhagische Gastroenteritis verursacht, die oftmals mit schmerzhafter Atmung, mit schleimig-eitrigem Nasenausfluß, Konjunktivitis und bei weiblichen Tieren auch mit Entzündungen des Genitale und mit Abort verbunden ist (TERPSTRA, 1969; MUNDERLOH, 1977).

Bei Menschen kommt es, wenn auch offenbar selten, zu einer gutartigen Erkrankung, die mit Fieber, Kopf-, Bauch- und Rückenschmerzen und mit einer Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens einhergeht (KIRYA et al., 1972).

2.2.3. Serologische Beziehungen

Die NSD-Serogruppe besteht derzeit aus 3 Virusspezies; dem NSD-, dem Ganjam- und dem Dugbe-Virus. Die serologische Verwandtschaft der einzelnen Vertreter zueinander ergab sich aus ihrem Verhalten in der KBR (BERGE, 1975). Das Ganjam-Virus steht dabei dem NSD-Virus besonders nahe. Möglicherweise werden einmal durch andere serologische Verfahren die gegenseitigen Beziehungen weiter abgeklärt.
Die Zuordnung der Spezies der NSD-Gruppe zu den bunyavirusähnlichen Viren wird insbesondere noch durch die serologische Verwandtschaft mit Vertretern der Crimean hemorrhagic fever-Gruppe gerechtfertigt. Diese Beziehungen zwischen den beiden Serogruppen stellen sich folgendermaßen dar: In der KBR besteht zwischen dem Ganjam-Virus und dem Semunya-Virus (Stamm des Congo-Virus der Crimean hemorrhagic fever-Gruppe) eine Kreuzreaktion (BISHOP und SHOPE, 1979). Das NSD-Virus wiederum ist serologisch mit dem Hazara- und dem Ib Ar 10.200 Virus verwandt, die ebenfalls der Crimean hemorrhagic fever-Gruppe zugehören. Dies konnte durch indirekte Hämagglutination (IHA) und Immunofluoreszenz aufgezeigt werden (CASALS, 1978).

2.2.4. Morphologie der zur NSD-Serogruppe gehörenden Erreger

2.2.4.1. Dugbe- und Ganjam-Virus

Für das Dugbe-Virus konnten DAVID-WEST und PORTERFIELD (1974) und für das Ganjam-Virus MURPHY, HARRISON und WITHFIELD (1973) zeigen, daß sich diese Erreger morphologisch nicht von den anderen Bunyaviren unterscheiden (Vgl. Nr. 2.1.3.).

2.2.4.2. NSD-Virus

Als erster berichtete TERPSTRA (1969) über Untersuchungen zur Morphologie des NSDV in Ultradünnschnitten von infizierten BHK 21/13 - Zellen. Bei 7000-facher Vergrößerung stellten sich die in gefärbten Präparaten zu beobachtenden intrazytoplasmatischen Einschlußkörperchen als breite amorphe Massen dar. In den Zellen waren weiterhin mehrere nicht immer scharf begrenzte, 300 - 1500 nm große Vakuolen vorhanden, in denen der Autor bei 35.000 - 200.000-facher Vergrößerung Partikel fand, die er für NSD-Virionen hielt. Sie waren entweder rundlich bis oval oder von langgestreckter Form. Die runden Partikel besaßen Durchmesser von mindestens 70 $\pm$ 15 nm und höchstens 80 $\pm$ 17 nm. Die länglichen Formen waren bei einer Querschnittsbreite von 60 nm bis zu 500 nm lang. Zahlenmäßig waren mehr runde bzw. ovale als langgestreckte Partikel zu beobachten. Ob dabei sphärische und tubulär geformte Virionen nebeneinander vorlagen, oder ob die rundlichen Formen nur Anschnitten von tubulären Partikeln entsprachen, konnte von TERPSTRA (1969) nicht schlüssig geklärt werden. Ebenso war es ihm nicht möglich, bestimmte Formen als Virusvorstufen anzusprechen oder Budding-Prozesse zu beobachten. Das Aufbauprinzip der Partikel erschien bei allen beobachteten Formen gleich: Ein elektronendichtes Zentrum war von einer engen

Zone geringer Dichte und einer wiederum elektronendichteren äußeren Schicht umgeben. Die innere Membran maß in ihrer Breite etwa 2,5 nm, die äußere, vermutlich aus Projektionen bestehende Schicht etwa 6 nm. Die Partikel lagen teilweise innerhalb der Vakuolen dicht gepackt oder nur einzeln bzw. in geringer Anzahl vor, wobei sie sich oftmals mehr in der Nähe der Vakuolenwandung befanden. Alle Formen ließen sich nicht nur intrazellulär, sondern auch jenseits der zytoplasmatischen Membran nachweisen.

MUNZ und GÖBEL (1977) untersuchten ebenfalls anhand von Ultradünnschnitten infizierter BHK 13 - Zellen die NSDV-Morphologie. Die Fixation der Proben erfolgte mit Glutaraldehyd, die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat. Die Autoren fanden in intrazytoplasmatischen Vakuolen Partikel, die den von TERPSTRA (1969) beschriebenen ähnelten. Die Langformen waren bis zu 730 nm lang und besaßen einen Durchmesser von 50 - 60 nm; die Partikel waren, durch die Lage zur Schnittebene bedingt, von gerader, gebogener, langer, kurzer oder ovaler Form und von einer Doppelmembran begrenzt. Sie zeigten gelegentlich Innenstrukturen, die von einer helikalen Beschaffenheit zu sein schienen. All diese Partikel kamen in den Vakuolen in einer geringen Anzahl vor. Andererseits schien es in manchen Vakuolen zu einer Virusanhäufung gekommen zu sein. In derartigen Ansammlungen dominierten mehr runde, ebenfalls von Doppelmembranen umgrenzte Gebilde mit Durchmessern von 55 - 65 - 70 nm. Die Autoren deuteten diese dichtgelagerten, rundlichen Partikel als Endstufen der Virusvermehrung. Demgegenüber ordneten sie die oben beschriebenen länglichen Formen einer früheren Phase der Replikation zu. Hierfür sprachen auch deutlich erkennbare "Budding-Prozesse", aus denen die länglichen Formen hervorzugehen schienen.
Angaben über die Morphologie freier isolierter Viruspartikel nach Darstellung mit Hilfe der "negative staining"-Methode liegen nicht vor.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Abkürzungen

BHK	Babyhamsternieren
DMSO	Dimethylsulfoxid
fKS	fetales Kälberserum
GAH	Glutaraldehyd
LD_{50}	Letaldosis (50 %)
M	Medium
MEM	Minimal Essential Medium
NSD (V)	Nairobi Sheep Disease (-Virus)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Trypsin-Kochsalzlösung
PEG	Polyäthylenglykol
Pge.	Passage
p.i.	post infectionem
PWS	Phosphorwolframsäure
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SchN	sekundäre bzw. tertiäre Schafnierenzellen
St.	Stamm
TPB	Tryptose-Phosphat-Bouillon
UA	Uranylacetat
z.p.E.	zytopathischer Effekt

3.1.2. NSD-Virusstämme

Wir verwendeten die NSDV - Stämme 045 und I 105, die ursprünglich in Kenia aus Schafen isoliert wurden (nähere Angaben zur Herkunft siehe MUNDERLOH (1977)). Sie werden im Institut auf mehreren Zellsystemen und in Babymäusen schon seit geraumer Zeit weitergezüchtet.

3.1.3. Zellkulturen

3.1.3.1. Schafnierenzellen

Wir verwendeten Sekundär- und Tertiärkulturen von SchN.

Zur Herstellung von Primärkulturen entnahmen wir die Nieren von unmittelbar zuvor geschlachteten Schafen (Schlachthof München). Die Kulturen wurden in üblicher Art und Weise angelegt. Die Einsaatkonzentration betrug 300.000 - 500.000 Zellen /ml, die Bebrütungstemperatur lag bei 37° C. Als Anzuchtmedium diente HEPES-gepuffertes Medium 199 (Fa. Seromed München) mit 10 % fetalem Kälberserum. 3 - 5 Tage nach der Einsaat war der Zellrasen dicht gewachsen. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach Überschichtung mit PBST-Lösung (0,25 % Trypsin), die nach zwei Minuten wieder abgesaugt wurde, und anschließender 15-minütiger Inkubation bei 37° C durch Abspritzen vom Boden der Kulturgefäße. Danach suspendierten wir die Zellen in 15 ml DMSO-Lösung (60 % Medium 199,30 % fKS und 10 % DMSO) pro Rouxschale und froren davon 1 ml - Portionen bei einer Temperatur von - 80° C zur Lagerung ein.

Um Sekundärkulturen herzustellen tauten wir dieses Konzentrat rasch auf und verdünnten es mit Medium 199 im Verhältnis 1 : 20.

Nach 3 - 4 Tagen Inkubation bei 37° C bildete sich ein einschichtiger Zellrasen aus, der dann zur Gewinnung von Tertiärkulturen wieder mit PBST abgelöst wurde. Die Zellen verdünnten wir dabei im Verhältnis 1 : 3 mit Medium 199, das auch als Erhaltungsmedium diente.

3.1.3.2. Babyhamsternierenzellinie BHK 13

Die Anzüchtung erfolgte unter Verwendung von Eagle's MEM (modifiziert nach Dulbecco) mit 10 % fKS und 10 % TPB. Dichte Zellrasen stellten sich nach etwa 3 Tagen bei einer Bebrütungstemperatur von 37° C ein. Als Erhaltungsmedium diente M 199 mit 10 % fKS. Bei 28° C hielten sich die Zellrasen mindestens 14 Tage. Mit der oben beschriebenen Methode der Abdauung durch PBST wurden die Zellen von der Gefäßwand gelöst und im Verhältnis 1 : 6 zur Ausgangsmenge subkultiviert.

3.1.3.3. Rattenastrozytenzellinie C_6

Die Vermehrung der Zellen erfolgte im Verhältnis 1 : 5 in Eagle's MEM (modifiziert nach Dulbecco) mit 10 % fKS bei 37° C. Zur Erhaltung verwendeten wir MEM Hanks mit 2 % fKS und lagerten die Kultur bei 28° C.

3.1.4. Kulturgefäße

Zur Anzucht von primären SchN wurden Rouxschalen (Einfüllmenge 100 ml) verwendet. Die Zellinien sowie die sekundären und tertiären SchN wurden in Kunststoffgefäßen der Firma Nunc (Einfüllmenge 40 ml bzw. 80 ml bei 80 cm² bzw. 175 cm² Bodenfläche) gehalten.

3.1.5. Versuchstiere (Mäuse)

Die zur Titration und Virusanzüchtung der NSDV - Stämme verwendeten Saugmäuse (Stamm NMRI) stammten aus institutseigener Zucht. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen (ein Wurf pro Käfig). Die Muttertiere erhielten Alleinfutterpellets (Fa. Altromin) und Wasser ad libitum.

3.1.6. Züchtung des NSD-Virus in Zellkulturen

Aus den dichtbewachsenen Kulturgefäßen entfernten wir zuerst das gesamte Wachstumsmedium. Anschließend wurde auf die Kulturen 20 (50)* ml Erhaltungsmedium und 5 (10)* ml Virussuspension gegeben. Nach einer 3-stündigen Bebrütung bei 37° C saugten wir das Animpfmaterial wieder vorsichtig ab, wuschen den Zellrasen einmal mit 20 (50)* ml Erhaltungsmedium und gaben schließlich erneut 40 (80)* ml Erhaltungsmedium zu. Die SchN inkubierten wir nach der Infektion bei 37° C, die BHK- und C_6-Zellinien bei 28° C. Nach 4, 5 und 6 Tagen p.i. entnahmen wir jeweils 2 ml Medium aus den Kulturgefäßen für die Untersuchung im Elektronenmikroskop. Am 6. Tag p.i. froren wir die Zellkulturen bei -25° C ein und tauten sie wieder auf, um zellgebundenes Virus freizusetzen. Von dieser Suspension wurde ein Teil bei 2200 g 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand für die Präparation zur elektronenmikroskopischen Untersuchung bereitgestellt. Der Rest wurde in nichtabzentrifugierter Form als Impfmaterial für die nächste Viruspassage sofort in oben beschriebener Weise weiterverwendet oder für spätere Passagen bei -80° C gelagert.

Zur morphologischen Untersuchung dienten uns folgende Viruspassagen:

St. 045: 79. - 90. SchN-Pge.
80. - 90. BHK- Pge.
71. - 74. C_6 - Pge.

*) Zahlenangaben in Klammern gelten für 175 cm² - Kulturgefäße

St. I 105: 78. - 90. SchN-Pge.
53. - 64. BHK -Pge.
62. - 65. C_6 -Pge.

3.1.7. Titration von Virusmaterial

Bei der Titration in Zellkulturen kann der Charakter des z.p.E. (siehe Abschn. 3.2.1.) bei der Beurteilung besonders dann Schwierigkeiten bereiten, wenn geringe Virusmengen verimpft werden. Wir verwendeten deshalb bei Titrationen Saugmäuse, die sich bereits für einen exakten NSDV-Nachweis geeignet erwiesen haben (MUNDERLOH, 1977; WEINBREN et al., 1958).

Die gewonnenen Virussuspensionen verdünnten wir in 10er-Potenzen mit Eagle's MEM. Je 4 - 6 bis zu 3 Tage alte Saugmäuse erhielten 0,02 ml der selben Verdünnungsstufe / Tier intracerebral verimpft. Kontrolltiere bekamen Medium verabreicht. Die Beobachtungsdauer belief sich auf 14 Tage. Als positiv wurden all die Tiere gerechnet, die ab dem 2. Tag p.i. verendeten. Die Berechnung der LD_{50}-Werte erfolgte nach der Methode von KÄRBER (1931).

3.1.8. Virusgewinnung aus Saugmäusen

Von moribunden Tieren der Titrationsversuche entnahmen wir um den 3. Tag p.i. die Gehirne und froren sie bei -25° C ein. Jeweils 4, noch nicht wieder aufgetaute Organe wurden in einer Reibschale mit einem Pistill homogenisiert. Nach Suspendierung der Masse in 4 ml PBS zentrifugierten wir das Material durch eine Zentrifugation in einem Saccharosegradienten (siehe Abschn. 3.1.9.3.1.).

3.1.9. Ultrazentrifugationsmethoden

3.1.9.1. Airfuge-Ultrazentrifugation

Mit dieser Art von Zentrifugen ist es unter anderem möglich, die in kleinen Volumina enthaltenen Viruspartikel direkt und ohne Zwischenarbeitsgänge auf elektronenmikroskopische Objektträger aufzuschleudern. Hierzu sind für die Probenröhrchen dieser Ultrazentrifuge spezielle Adapter, die zur Aufnahme eines Cu-Objektträgernetzchens dienen, entwickelt worden. Die Objektträger befinden sich während des Zentrifugenlaufes durch ihre Fixierung in den Adaptern in paralleler Lage zur Rotorachse. Die Teilchen der Probensuspension sedimentieren dabei direkt auf die Netzchen.

Die Airfuge (Fa. Beckman Instruments) besitzt das Funktionsprinzip einer Druckluftturbine. Der Antrieb erfolgt durch einen kontinuierlich regelbaren Luftstrom, der durch entsprechend angeordnete Düsen auf die Turbinenprofilrillen des Rotorkopfes geleitet wird. Die Geschwindigkeit kann so durch die Regelung des Betriebsluftdruckes abgestimmt werden. Der Leichtmetallrotor läuft nahezu reibungsfrei auf einem Luftpolster. Die Rotortemperatur liegt während des Betriebes nur wenige Grade über der Raumtemperatur. Die maximale Umdrehungszahl / min beträgt bei einem Betriebsluftdruck von 28 psig (1 psig = 0,071 kp/cm^2) 100.000 Upm. Mit dieser Geschwindigkeit wird eine maximale relative Zentrifugalbeschleunigung von 160.000 g mit einem Mittelwert von 132.000 g (gem. DIN 58970 Bl. 1) erzeugt. Die höchstmögliche Umdrehungszahl wird bereits nach 30 sec erreicht. Der Festwinkelrotor kann mit bis zu 6 Probenröhrchen mit je 175 µl Probenlösung beschickt werden.

3.1.9.1.1. Präparationstechnik

Ein Tropfen der Virussuspension wird in die für das Objektträgernetzchen vorgesehene Bohrung des Adapters verbracht. In diesen Tropfen muß das Netz mit einer Pinzette vorsichtig eingeschoben werden, so daß es genau in der Bohrung zu liegen kommt.

Danach führt man den Adapter in das Zentrifugenröhrchen ein und beschickt dieses mit 50 µl Probensuspension. Nach der Zentrifugation ist das Netz vorsichtig zu entnehmen.

3.1.9.1.2. Testläufe der Airfuge mit verschiedenen Virusspezies unter variierten Zentrifugationsbedingungen

Um Erfahrungen in der Präparationstechnik, insbesondere bezüglich der Qualität der elektronenoptischen Darstellung der Viruspartikel zu sammeln, untersuchten wir Suspensionen verschiedener Virusarten:

Vaccinia-Virus, St. MVA, Pockenimpfstoff
Vaccinia-Virus, St. Elstree, Pockenimpfstoff
Ektromelie-Virus, St. Hamostead, 381. 3 T_6 - Pge.
Gelbfiebervirus, Impfvirus, Robert-Koch-Institut, Berlin, 2. BHK 13 - Pge.
REO-Virus, Serotyp 3, 7. Vero - Pge.
Bovines Adeno-Virus, Serotyp 3, 1. SchN - Pge.

Wir variierten Zentrifugationszeiten und Zentrifugalbeschleunigungen, um eine Beziehung zwischen diesen Parametern und dem Anreicherungseffekt bzw. der Abbildungsqualität bei der elektronenmikroskopischen Darstellung zu finden. Zentrifugiert wurde zwischen 40.000 und 100.000 g in verschiedenen Zeiten von 5 Minuten bis zu einer Stunde. Als Kontrollen fertigten wir zu den einzelnen Proben Adsorptionspräparate an (siehe Abschnitt 3.1.14.).

3.1.9.1.3. Sedimentation von NSDV-Material

Die vorgeklärten Suspensionen aus den eingefrorenen und wieder aufgetauten infizierten Zellkulturen, die Mediumüberstände und die Serum/Virussuspension-Gemische (siehe Abschnitt 3.1.10.) wurden entsprechend den Ergebnissen aus den Airfuge-Testläufen bei etwa 65.000 g 10 - 15 Minuten lang zentrifugiert. Bei den Fraktionen

der Saccharosedichtegradienten (siehe Abschnitt 3.1.9.3.) variierten wir bei 65.000 g die Laufzeiten je nach Gehalt an Begleitsubstanzen zwischen 5 und 15 Minuten.

3.1.9.2. Konzentrierung von Virusmaterial mit der Ultrazentrifuge L2 - 65 B (Fa. Beckman Instruments)

Zur Klärung von größeren Partikeln, wie Zellbruchstücken, zentrifugierten wir die Proben zuerst niedertourig bei 2.200 g 5 Minuten lang. Vom Überstand verbrachten wir je 14 ml in die Röhrchen eines 50-TI-Festwinkelrotors der Ultrazentrifuge und sedimentierten die Suspension bei 40.000 Upm (mittlere RZB : 123.000 g) während einer Laufzeit von 30 Minuten. Die Pellets wurden in je 0,2 ml Überstand aufgenommen. Diese Konzentrate verbrachten wir mittels einfacher Adsorption auf ein Objektträgernetzchen.

3.1.9.3. Dichtegradientenzentrifugationsversuche (Ultrazentrifuge L2 - 65 B)

Virusmaterial wurde in Saccharosegradienten zentrifugiert, um eine Konzentration und gleichzeitig eine Reinigung der Viruspartikel zu erreichen.

3.1.9.3.1. Fraktionierung von Virussuspensionen

Wir schichteten jeweils 3,3 ml einer 50, 40 und einer 30 %-igen Saccharoselösung übereinander. Als oberste Schicht folgten jeweils 2,5 ml Virussuspension (Homogenisate von Gehirnen infizierter Saugmäuse sowie virushaltiges Zellkulturmaterial. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW 40 - Rotor 60 bzw. 120 Min. lang bei 22.000 Upm (mittlere RZB : ca. 60.000 g). Um die Teilmengen aus dem Gradienten ohne Vermischung absaugen zu können, verwendeten wir eine Spritze mit einer am Ende im rechten Winkel abge-

bogenen Kanüle, die wir vorsichtig von oben in die Flüssigkeitssäule eintauchten. Wir entnahmen so die entstandenen Banden bzw. die Fraktionen, die sich augenscheinlich nur durch ihre verschiedenen Dichten, d.h. ihre Lichtbrechungskoeffizienten unterschieden. Alle Teilmengen wurden in mit permeablen Membranen verschlossene Probenröhrchen verbracht. Die Gefäße befestigten wir mit dem Membranverschluß nach unten am Rand einer mit PBS gefüllten Glasschale, so daß sie in die PBS-Lösung eintauchten. Unter Einsatz eines Magnetrührers dialysierten wir so die Zuckerlösungen 60 Stunden lang bei 4° C. Das Dialysat wurde dabei mehrmals gewechselt. Dichtebestimmungen durch Wägen der Fraktionen zeigten jedoch, daß einzelne Fraktionen noch ein spezifisches Gewicht besaßen, das einer Saccharoselösung von etwa 10 % entsprach. Deshalb wurden die einzelnen Fraktionen noch anschließend mit PBS 1 : 3 verdünnt, um den Zuckeranteil in den Proben möglichst gering zu halten. Von jeder so behandelten Teilprobe fertigten wir mit der Airfuge (s.u.) Präparate für den elektronenmikroskopischen Virusnachweis an.

3.1.9.3.2. Sedimentierung von NSDV durch einen 5 - 20 %-igen Saccharosegradienten

Viruskonzentrate, die wir mittels PEG-Präzipitation gewonnen hatten (89. SchN-Pge., St. O 45 und 88. SchN-Pge., St. I 105), versuchten wir in einem Saccharosegradienten einer weiteren Reinigung und Konzentration zu unterziehen. Von den Proben verbrachten wir jeweils 0,5 ml auf einen 5 - 20 %-igen linearen Saccharosegradienten (12 ml). Um nicht durch eine zu lange Laufzeit des SW-40-Rotors bei einer bestimmten RZB unnötig viel Begleitsubstanz zu sedimentieren, bestimmten wir die Sedimenta-

tionszeit für NSDV-Partikel nach der Formel:

$$t_s = \frac{k}{s} \quad \text{(in Stunden)}$$

Dabei ist: t_s Sedimentationszeit

k Rotorkonstante; es gehen neben der Länge des Sedimentationsweges, Umdrehungszahl, Temperatur, u.a. auch die Dichte der zu sedimentierenden Substanz in den Wert ein. Da die Dichte des NSDV nicht bekannt ist, aber vermutlich im Bereich von 1,17 - 1,19 $\frac{g}{cm^3}$ liegt (siehe Abschnitt 2.1.4.), bestimmten wir Näherungswerte für k mit Hilfe einer Tabelle von SMOCK und BELLIS (1972), die verschiedene k-Werte in Abhängigkeit von der Partikeldichte angibt.

s Sedimentationskonstante; für Bunyaviren: 350 - 470 S

Nach dieser Formel errechnete sich für Partikel mit der angenommenen Dichte 1,17 $\frac{g}{cm^3}$ und dem zugehörigen k-Wert von ca. 818 und einer Sedimentationskonstante von 350 S bei einer Rotorgeschwindigkeit von 30.000 Upm (mittlere RZB : 111.700 g) eine erforderliche Sedimentationszeit von 140 Minuten. Für eine Dichte von 1,19 $\frac{g}{cm^3}$, einen k-Wert von 430 und eine Sedimentationskonstante von 470 S bei 40.000 Upm (mittlere RZB : 198.750 g) betrug die zur Partikelsedimentation notwendige Zeit 55 Minuten. (Die Wahl von unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten war aus technischen Gründen nötig, in der Berechnung wurde dies jedoch durch eine entsprechende Angleichung des k-Wertes nach der Formel: $k_{(30.000\ Upm)} = k_{(40.000\ Upm)} \times \frac{40.000^2}{30.000^2}$ berücksichtigt).

Jeweils ein Teil einer Probe wurde nunmehr 55 bzw. 140 Minuten bei 5° C mit den oben genannten Umdrehungszahlen zentrifugiert. Nach dem Lauf gewannen wir vorsichtig mit einer Spritze aus dem

Zentrifugenröhrchen die Flüssigkeit und nahmen das Sediment in 0,1 ml Trispuffer (0,1 M, pH 7,6) auf und verdünnten diese Suspension anschließend 1 : 100 mit Trispuffer gleicher Art, um die Zuckerkonzentration herabzusetzen. Mit dem Airfugeverfahren wurden schließlich Präparate für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen angefertigt.

3.1.10. Immunoelektronenmikroskopische Versuche

Als Antikörpermaterial verwendeten wir Seren von Schafen früherer Versuche, die mit NSDV infiziert worden waren (MUNDERLOH, 1977) und die Krankheit überstanden hatten.

Wir stellten mit Serum und Virussuspension jeweils eine Mischung im Verhältnis 1 : 1 her, die anschließend 12 Stunden bei 4° C aufbewahrt wurde. Dann verdünnten wir das Gemisch 1 : 100 mit Aqua dest. und sedimentierten das Material in der Airfuge auf Objektträger. Folgende Konjugate untersuchten wir auf diese Weise:

Serum vom 12. Tag p.i. (Schaf J) / 64. BHK-Pge., St. 0 45
Serum vom 12. Tag p.i. (Schaf J) / 87. SchN-Pge., St. 0 45 (nach PEG-Fällung, siehe Abschnitt 3.1.11.)
Serum vom 14. Tag p.i. (Schaf O) / 73. C_6-Pge., St. 0 45
Serum vom 15. Tag p.i. (Schaf Q) / 64. BHK-Pge., St. 0 45
Serum vom 15. Tag p.i. (Schaf Q / 87. SchN-Pge., St. 045 (nach PEG-Fällung)

3.1.11. Präzipitation mit Polyäthylenglykol

Bei der Durchführung dieses Reinigungsverfahrens hielten wir uns an die Methode von MAYR et al. (1977):
Mit O,1 M Trispuffer (Trishydroxymethylaminomethan), pH 7,6, stellten wir eine 50 %-ige PEG-Lösung her (PEG-Molekulargewicht : 6.000), die 15 Minuten bei 120° C und 1,2 bar sterilisiert wurde. Wir vermischten sie mit Virussuspension im Verhältnis 1 : 5. Bei den Virussuspensionen handelte es sich um gefrorene und wieder aufgetaute, infizierte SchN-Kulturen (87. - 90. SchN-Pge., St. 0 45 und 86. - 90. SchN-Pge., St. I 105), die zuvor bei 2.200 g 5 Minuten lang vorgeklärt worden waren. Das Gemisch wurde bei 4° C 2 Stunden lang gerührt und 20 Minuten bei 2.200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte eine dreimalige Elution nach folgendem Verfahren: Wir resuspendierten das sedimentierte Präzipitat mit Elutionspuffer, pH 7,6 (0,1 M Trispuffer mit 85 g NaCl/l). Nach 20-minütiger Inkubation bei 4° C mit mehrmaligem Schütteln erfolgte eine Zentrifugation bei 2.200 g über 20 Minuten. Den Überstand saugten wir vorsichtig mit einer Spritze ab und bewahrten ihn bei 4° C auf, während wir mit dem Sediment die nächste Elution durchführten. Die jeweils zur Resuspendierung verwendeten Mengen an Elutionspuffer entsprachen etwa $\frac{1}{80} - \frac{1}{100}$ des Volumens der Virusausgangssuspension. Die Überstände der drei Elutionen gaben wir nun zusammen und klärten das Gemisch durch eine letzte, 10 Minuten dauernde Zentrifugation bei 2.200 g.

Von diesem Konzentrat fertigten wir nach der Adsorptionsmethode Präparate für die elektronenmikroskopische Untersuchung an.

3.1.12. Glutaraldehydfixation

Wir hielten uns an die Methode von BONSDORFF und PETTERSON (1975), die sie zur Darstellung des Uukuniemi-Virions anwendeten. Wir benutzten eine handelsübliche 25 %-ige Glutaraldehydlösung, die wir mit der jeweiligen Virussuspension auf eine 0,7 - 1 %-ige Konzentration verdünnten.

3.1.13. Elektronenmikroskop-Objektträger

Wir benutzten Cu-Objektträgernetzchen mit einem Durchmesser von 3,2 und 2,5 mm. Diese besaßen Maschendichten von 200 bzw. 400 Maschen / inch^2. Als Trägerfolien untersuchten wir Formvar- und Pioloformschichten auf ihre Eignung. Wir verwendeten auch Netze, die mit Kohle bedampft oder beglimmt worden waren. Die Diche der Kohleschicht betrug in beiden Fällen 5 nm. Bevor das Probenmaterial auf die Netze verbracht wurde, tauchten wir einige der Objektträger in eine 0,1 %-ige wässerige Poly-L-Lysin-Lösung und wuschen sie wieder kurz in Aqua dest.. Durch diese Behandlung soll eine größere Hydrophilie der Netzoberfläche erreicht werden (MÜLLER, NIELSEN und BAIGENT, 1980).

3.1.14. Beschicken der Netze mittels der Adsorptionsmethode

Ein Tropfen Probenmaterial wurde in einer Petrischale auf ein Stück Parafilm verbracht. Wir legten den Objektträger mit seiner Trägerfilmschicht auf diesen Tropfen und beließen ihn dort 1 Minute lang. Anschließend saugten wir den Flüssigkeitsrest mit einem Filterpapierstück vorsichtig von der Netzoberfläche ab und führten die Negativkontrastierung durch.

3.1.15. Negativkontrastierung

Wir verwendeten als Kontrastierungsmittel 2 %-ige Lösungen von Phosphorwolframsäure mit pH-Werten von 5,0, 6,8, 7,5 und 8,0 sowie eine 2 %-ige Uranylacetatlösung mit einem pH-Wert von 4,4, doch wurde meist nur mit PWS, pH 6,8 gearbeitet. Nach der Entnahme der Netzchen aus dem Adapter bzw. nach der Adsorption saugten wir noch vorhandene Probenflüssigkeit mit einem Stück Filterpapier vom Objektträger. Dort, wo eine stärkere "Verunreinigung" der Netze durch einen hohen Gehalt an Eiweiß, Zelltrümmern u.ä. zu erwarten war, versuchten wir einen Reinigungseffekt durch ein- oder mehrmaliges Eintauchen des Objektträgers in Aqua dest. zu erreichen. Wenn möglich, verzichteten wir jedoch darauf, um einen etwaigen Virusverlust zu vermeiden. Dann verbrachten wir einen Tropfen des Kontrastierungsmittels auf das Cu-Netzchen, saugten ihn nach ca. 20 sec. wieder ab und wuschen das Präparat 1 x in Aqua dest., um einer Überkontrastierung entgegenzuwirken. Diese Methodik, bei der zuerst Probenmaterial und dann Kontrastierungsmittel auf das Netz verbracht werden, bezeichnet man oftmals als "Kontrastierung von oben". Entsprechend versteht man unter "Kontrastierung von unten" den umgekehrten Vorgang (MÜLLER, 1975). Diesem Prinzip folgend ließen wir in einigen Fällen zuerst einen dünnen Film PWS auf dem Objektträgerfilm eintrocknen und zentrifugierten erst dann Probenmaterial auf.

Schließlich führten wir noch ein sog. "simultanes Kontrastierungsverfahren" durch, wobei wir die Virussuspension zuerst mit PWS im Verhältnis 1 : 1 bis 5 : 1 vermischten und dann in der Airfuge auf das Netz sedimentierten.

3.1.16. Ultrahistologische Untersuchung von NSDV-infizierten Zellen

Aus einer beimpften SchN-Kultur mit deutlichem z.p.E. stellten wir sowohl Ultradünnschnitte als auch negativ staining - Präparate her, um intra- mit extrazellulären isolierten Virionen vergleichen zu können. Als Material diente uns die 89. SchN-Pge., St. 0 45 am 3. Tag p.i.. Als Kontrolle wurde eine unbeimpfte tertiäre SchN-Kultur in gleicher Weise behandelt.

Vom Boden des 800 ml - Kulturgefäßes entfernten wir die Hälfte des Zellrasens durch Abschaben mit einem "Rubber-Policeman". Aus 40 ml Zellsuspension schieden wir durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 2.200 g die abgelösten Zellen ab, die zur Herstellung der Ultradünnschnitte dienen sollten. Die noch im Kulturgefäß verbliebene andere Hälfte behandelten wir wie üblich durch Einfrieren und Wiederauftauen zur Freisetzung von zellgebundenem Virus, um anschließend damit eine PEG-Präzipitation durchzuführen.

Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte in folgender Weise: Als Fixativ diente 2,5 % Glutaraldehyd (Fa. Merck) in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2 für die Dauer von einer Stunde, woraus die Zellen wieder durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2.000 Upm gewonnen wurden. Nach 4-maligem, mehrstündigem Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2 - jedesmal mit einer Zentrifugation unter oben beschriebenen Bedingungen verbunden - erfolgte eine einstündige Nachfixation durch Osmiumtetroxid (OsO_4) in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2. Danach wurden die Zellen erneut 4-mal nach der erwähnten Methode gewaschen. Zur Dehydrierung diente zuerst 50 %-iges Äthanol, das 3 x 5 Minuten auf die Probe einwirkte und 1 % Uranylacetat in 70 %-igem Äthanol für die Dauer

von 12 Stunden, womit die Zellen gleichzeitig zwischenkontrastiert wurden. In 90 %-igem Äthanol erfolgte ein weiterer Wasserentzug für 30 Minuten. Alle bisher beschriebenen Präparationsschritte liefen bei 4° C ab. Zur abschließenden Dehydrierung kamen die Zellen für 2 x 30 Minuten bei Zimmertemperatur in Äthanol abs.. Als Intermedium diente Propylenoxid zuerst als Reinsubstanz für 2 x 15 Minuten. Dann erfolgte eine Behandlung der Zellen mit den Mischungen aus Propylenoxid und Durcupan ACM (Fa. Fluka) zu gleichen Teilen für die Dauer von einer Stunde und aus 1 Teil Propylenoxid und 3 Teilen Durcupan über 12 Stunden. Danach wurden die Zellen für 2 x 1 Stunde bei 50° C in reines Durcupan in Gelatinekapseln abgefüllt. Das Material polymerisierte bei 60° C 48 Stunden lang. Nach dem Lösen der Gelatinekapseln in kaltem Wasser fertigten wir mit einem Ultratome III (Fa. LKB) von den Blöcken 30 nm dicke Ultradünnschnitte an, die wir mit einem Cu-Objektträgernetzchen aufnahmen und nach der Methode von REYNOLDS (1963) kontrastierten.

3.1.17. Elektronenmikroskop

Wir verwendeten zu unseren Untersuchungen ein Siemens Elmiskop 101. Die Präparate wurden bei 20.000 und 40.000-facher Vergrößerung durchgemustert. Die Röhrenspannung betrug 60 oder 80 kV.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Züchtung von NSDV

Einen z.p.E. konnten wir nur bei den SchN-Kulturen feststellen. Sie zeigten bei jeder Passage beider NSDV-Stämme deutliche Veränderungen. Besonders charakteristisch war das manchenorts spinnwebenartige Aussehen des Zellrasens, bedingt durch die Ausbildung fadenförmiger Plasmabrücken. Oftmals erschien das Zytoplasma schaumig und vakuolisiert. Ein Teil der Zellen kugelte sich ab und löste sich vom Boden des Kulturgefäßes. Der z.p.E. trat bei den verschiedenen Passagen frühestens ab dem 3. Tag p.i. unterschiedlich stark auf.

3.2.2. Titration von Virusmaterial

Die Titer von folgenden NSDV-Passagen wurden bestimmt:

St. O 45 :	78. SchN-Pge.	$5 \times 10^{4,3}$	LD_{50}/ml
	82. "	$5 \times 10^{4,7}$	"
	87. "	$5 \times 10^{3,7}$	"
	79. BHK-Pge.	$5 \times 10^{2,9}$	"
	86. "	$< 10^{2}$	"
	74. C_6-Pge.	$< 10^{3}$	"
St. I 105:	82. SchN-Pge.	$5 \times 10^{4,5}$	"
	52. BHK-Pge.	$5 \times 10^{4,7}$	"
	59. "	$5 \times 10^{6,5}$	"
	64. "	$5 \times 10^{5,9}$	"
	65. C_6-Pge.	$5 \times 10^{2,3}$	"

Die infizierten Saugmäuse zeigten dabei folgendes Symptomenbild: Ein Zittern der Tiere und deutliche ataktische Bewegungen waren um den 4./5. Tag p.i. die ersten Anzeichen der Erkrankung. Im weiteren Verlauf stellte sich eine zyanotische Verfärbung der Haut ein, die Tiere begannen zu kümmern. Besonders deutlich waren Lähmungen und Streckkrämpfe anfangs der Hinter- und später der Vordergliedmaßen. Unter diesen zentralnervösen Symptomen und unter Atemnot verendeten die Tiere etwa am zweiten Tag nach Beginn der Erkrankung. Daneben beobachteten wir bei den niedrigen Verdünnungsstufen häufig einen perakuten Krankheitsverlauf.

3.2.3. Ultrazentrifugationsmethoden

3.2.3.1. Airfuge-Ultrazentrifugation

3.2.3.1.1. Testläufe

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von den mit der Airfuge hergestellten Präparaten zeigte in den meisten Fällen eine deutliche Anreicherung des Virusmaterials. Allgemein erwiesen sich relative Zentrifugalbeschleunigungen von etwa 65.000 g (70.000 Upm) und Laufzeiten von etwa 10 Minuten für den Virusnachweis günstig. Eine Erhöhung dieser Werte war meist von einer Zunahme verschiedener Begleitsubstanzen auf dem Objektträger begleitet, die sich störend auf die Darstellung von Feinstrukturen auswirkte. Daneben verursachten hohe g-Zahlen mitunter Verschiebungen, Faltenbildungen und Zerreißungen der Netzbeschichtung, so daß das elektronenmikroskopische Bild dieser Präparate von unzureichender Qualität war. In vergleichenden Untersuchungen gewannen wir den Eindruck, daß sich Einzelheiten in den Strukturen isolierter Partikel bei Anwendung des Adsorptionsverfahrens besser darstellten.

3.2.3.1.2. Sedimentation von NSDV-Material

In den einzelnen Zellkulturflüssigkeiten der meisten NSDV-Passagen konnten wir Partikel finden, die wir aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den bisher beschriebenen und im negative staining - Verfahren dargestellten Bunyaviren für NSD-Virionen halten. In den Kontrollpräparaten traten gleichartige Gebilde nicht auf. Die Viruspartikel waren in den Kulturüberständen am 4., 5. und 6. Tag p.i. des öfteren in etwa gleichgroßer Anzahl nachzuweisen wie in den entsprechenden Suspensionen nach Einfrieren und Auftauen. Bedingt durch den geringen Anteil an Begleitsubstanzen konnte man bei den Virionen aus den nicht eingefrorenen Zellkulturüberständen öfters Feinstrukturen besser erkennen.

Die Menge der gefundenen Partikel war von einer Zellkulturpassage zur nächsten nicht konstant. Auch kam es vor, daß auf eine Passage mit positivem Ergebnis eine mit einem negativen folgte und umgekehrt. Eine Gesetzmäßigkeit schien diesbezüglich nicht vorzuliegen.

Die Viren lagen meist in kleinen Aggregaten vor, einzeln waren sie selten zu beobachten. Sie besaßen nur selten eine vollkommen runde Gestalt, meist zeigten sie mehr oder weniger starke Deformierungen (siehe Abb. 1 und 2).

3.2.3.2. Konzentrierung von Virusmaterial mit der Ultrazentrifuge L2 - 65 B

Nach Einengung vorgeklärter Suspensionen der 84. BHK-Pge., St. 0 45 und der 87. BHK-Pge., St. I 105 mit nachfolgender Adsorption auf den Objektträger zeigten die Präparate folgendes Bild: Die

elektronenoptisch dichten Substanzen lagen meist in größeren undurchstrahlbaren Aggregaten vor. Die Verteilung über den Objektträger war ungleichmäßig. Wir fanden einige wenige Partikel, die in Form und Größe NSD-Virionen ähnelten, aber mit amorphem Material so bedeckt waren, daß sich keine Einzelheiten von Strukturen darstellten.

3.2.3.3. Dichtegradientenzentrifugationsversuche (Ultrazentrifuge L2 - 65 B)

3.2.3.3.1. Fraktionierung von Virussuspensionen

Die einmalige Reinigung der Mäusegehirnverreibungen im Saccharosegradienten (30 - 50 %) erwies sich als unzureichend. Die Präparate der einzelnen Banden zeigten in unterschiedlicher Menge amorphe Substanzen und Gewebsbruchstücke, jedoch keine verdächtigen Partikel. In den oberen Fraktionen des Zellkulturmaterials (86. SchN-Pge., St. 0 45) fanden wir vereinzelt verdächtige Partikel, ohne daß morphologische Einzelheiten festgestellt werden konnten.

3.2.3.3.2. Elektronenoptische Befunde nach Sedimentation von NSDV in einem 5 - 20 %-igen Saccharosedichtegradienten

In den Präparaten aus dem Sediment nach dem 55-minütigen Zentrifugenlauf konnten wir keine NSDV-Partikel nachweisen. Dagegen beobachteten wir in den Proben aus der nach 140 Minuten abzentrifugierten Substanz Virionen - allerdings in nur sehr geringer Anzahl - die in Klumpen aus amorphem Material lagen, oft nur andeutungsweise sichtbar waren und meist starke Deformationen aufwiesen. Der Einfluß des Milieus sowie die prä-

parationsbedingte Verdünnung schienen sich negativ auf die Nachweishäufigkeit ausgewirkt zu haben.

3.2.4. Immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen

Wir fanden in den Virussuspension-Serum-Gemischen Partikel, die meist in Aggregatform vorlagen. Viele von ihnen waren erheblich deformiert. Die Einzelstrukturen bildeten sich jedoch stets erkennbar ab. Besonders dort, wo Partikel aneinander zu liegen kamen, traten Projektionen deutlich hervor. Die Aggregate schienen dabei von einer elektronenoptisch dichten homogenen Masse umgeben zu sein.

3.2.5. Polyäthylenglykol-Präzipitation

In den Präparaten fanden wir kleine Aggregate von NSDV-Partikeln. Alle Feinstrukturen, wie der als deutliche äußere radiäre Streifung abgebildete Projektionenbesatz und das Partikelinnere mit einem feingekörnten oder -granulierten Aussehen, waren besonders gut dargestellt. Die Virionen wiesen vergleichsweise nur wenige Deformierungen auf. Die Qualität der Darstellung mindernde Begleitsubstanzen waren auf den Objektträgern in nur geringer Menge vorhanden (siehe Abb. 3 - 5).

3.2.6. Glutaraldehydfixation

Allgemein fanden wir in GAH-behandelten Virussuspensionen nur selten NSDV-Partikel. Lediglich in der 59. und 60. BHK-Passage, St. I 105, traten mehrere rundliche Gebilde mit einem Durchmesser von nur 60 nm und einem Besatz mit knopfartigen, etwa 8 nm großen Projektionen auf. Die Präparate der genannten Passagen

waren mit dem Airfugeverfahren hergestellt worden. Bei der 60. Pge., St. I 105, fanden wir die Partikel sowohl im zellfreien Überstand am 6. Tag p.i., als auch in der Zellsuspension nach Einfrieren und Auftauen der Kultur.

3.2.7. Elektronenmikroskop-Objektträger

Netzchen mit dem Durchmesser 3,2 und 2,5 mm zeigten sich beide für die Airfuge-Präparation geeignet. Deutlich erkennbar war der Einfluß der Maschendichte auf die Stabilität der Netzbeschichtung. Bei einem Wert von 400 Maschen/inch² traten weitaus weniger Defekte auf als bei 200 Maschen/inch², wenn vorher auf derart verschiedene Netze die gleiche RZB in der Airfuge eingewirkt hatte.

Formvar-beschichtete Netzchen zeigten sich des öfteren gegenüber Pioloform-befilmten bei einer hohen RZB nicht so widerstandsfähig, schienen aber eine schärfere Abbildung der Objekte zu ermöglichen.

Eine Kohlebedampfung oder -beglimmung der Netze bewirkte eine Erhöhung der Stabilität der Netzbeschichtung, die Abbildungsqualität wurde dadurch nicht beeinflußt.

Bei Poly-L-Lysin-behandelten Objektträgern hatten wir den Eindruck, daß es auf ihnen zu einer stärkeren Haftung und damit zu einer gleichmäßigeren Verteilung der aufzentrifugierten Substanz kommt.

3.2.8. Negativkonstrastierung

Die verschiedenen pH-Werte der PWS wirkten sich auf die Präparate vor allem in Form einer unterschiedlich intensiven Kon-

trastierung aus. PWS mit den pH-Werten 6,8 und 5,0 erwies sich als am besten geeignet. Nach Anwendung von PWS, pH 7,5 oder 8,0 erschien das kontrastierte Material oft koaguliert und mehr inhomogen. Mit UA, pH 4,4, behandelte Proben waren häufig überkontrastiert, wobei besonders die starke Anfärbung von Begleitsubstanz störend wirkte.

Das Waschen der mit Probenmaterial beschickten Netze in Aqua dest. bewirkte des öfteren einen deutlichen Virusverlust auf den Objektträgern.

Die als "Kontrastierung von unten" bzw. als "simultane Kontrastierung" bezeichneten Verfahren erwiesen sich besonders für Airfuge-Präparate kaum brauchbar, da häufig Überkontrastierungen und Zerreißungen der Objektträgerbeschichtungen auftraten. Als eindeutig überlegen erwies sich die Methode der "Kontrastierung von oben".

Trotz Einhaltung derselben Präparationsbedingungen bei der Kontrastierung von mehreren Proben, die aus derselben Virussuspension stammten, erhielten wir manchmal unterschiedliche Ergebnisse. Die Verteilung des Materials auf der Netzoberfläche und damit die Durchstrahlbarkeit des Präparates variierten in diesen Fällen, ohne daß erkennbare Gründe hierfür vorlagen.

3.2.9. Zusammenfassende Beschreibung der Morphologie der im negative staining dargestellten NSDV-Partikel

Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen, besonders der von Virus-Zellkultursuspensionen, ergibt sich folgendes Bild:

Die Partikel besitzen im Allgemeinen eine runde Gestalt, die durch die Einwirkung von Kräften bei der Präparation, wie z.B.

bei der Ultrazentrifugation, beeinträchtigt werden kann. So kommt es auch bei Aggregatbildung zu Veränderungen in Form von Scherungen, Eindellungen und Ausstülpungen, wodurch Größenunterschiede bedingt werden.

Der Partikeldurchmesser beträgt um 110 nm bei einer Schwankungsbreite von etwa 90 bis 120 nm.

Die Oberfläche der Virionen besteht aus einer ca. 10 nm breiten Schicht aus borstenartigen Projektionen. Dehnungseinflüsse bewirken anscheinend, daß sie sich an manchen Stellen deutlicher darstellen. Gut sichtbar sind sie auch an den Berührungsstellen von Partikeln.

Darunter schließt sich eine etwa 5 nm breite, elektronendurchlässige, membranartige Schicht an, die jedoch nicht regelmäßig zur Darstellung gelangt.

Die Partikel können unterschiedlich elektronendurchlässig sein, wodurch das "core" heller oder dunkler erscheinen kann. Die Innenstruktur des einzelnen Virions erscheint manchmal homogen mit wechselnder elektronenoptischer Dichte, jedoch lassen sich in vielen Fällen feingekörnte, oder auch streifige Strukturen erkennen. Diese stellen offensichtlich die Abbildung der Oberflächenprojektionen in der Aufsicht dar.

3.2.10. Ultrahistologische Untersuchung der mit NSDV infizierten Zellen

Bereits im Überblick erwiesen sich die infizierten Zellen im Vergleich zum Kontrollpräparat deutlich verändert. Besonders auffällig erschien uns die größere Anzahl intrazytoplasmatischer

Vakuolen, die wir bei der beimpften Kultur fanden. Bereits bei 20.000-facher Vergrößerung fielen uns in manchen Vakuolen rundliche Gebilde auf, die in kleinen und größeren Aggregaten bis zu etwa 20 Stück vorlagen und im Vergleich zu ihrer Umgebung stärker kontrastiert zu sein schienen. Bei 40.000-facher Vergrößerung ließen sich nähere, für Bunyaviren charakteristische Einzelheiten erkennen: Die Virionen waren stets von runder oder leicht ovaler Form. Die äußere Begrenzung bildete eine 9,5 nm dicke pelzartige, manchmal radiärgestreift erscheinende Schicht, auf die nach innen zu eine 4 nm dicke membranartige Schicht folgte. Das Innere der Partikel schließlich bildete sich als unterschiedlich elektronendichte, marmoriert erscheinende Masse ohne erkennbar geordnete Struktur ab. Der Gesamtdurchmesser der einzelnen NSD-Virionen betrug ca. 80 nm (siehe Abb. 6 - 8). Die von TERPSTRA (1969) und von MUNZ und GÖBEL (1977) beschriebenen Langformen konnten wir nicht auffinden.

3.2.11. Abbildungen

Die Abbildungen 1 - 5 zeigen freie NSDV-Partikel, die im negativ staining - Verfahren dargestellt sind.

Abb. 1: NSDV im Zellkulturüberstand der 82. SchN-Pge., St. 0 45, vom 6. Tag p.i. nach Anreicherung mit der Airfuge-Ultrazentrifuge
Vergrößerung: 240.000 x
Am Partikelrand sind die Projektionen (→), im Inneren die gekörnten Strukturen erkennbar.

Abb. 2: NSDV im Zellkulturüberstand der 83. SchN-Pge., St. 0 45, vom 5. Tag p.i. nach Anreicherung mit der Airfuge-Ultrazentrifuge
Vergrößerung: 160.000 x
Die einzelnen Partikel sind weitgehend in ihrer äußeren runden Form erhalten. Ein Virion zeigt im Zentrum eine streifige Zeichnung (→).

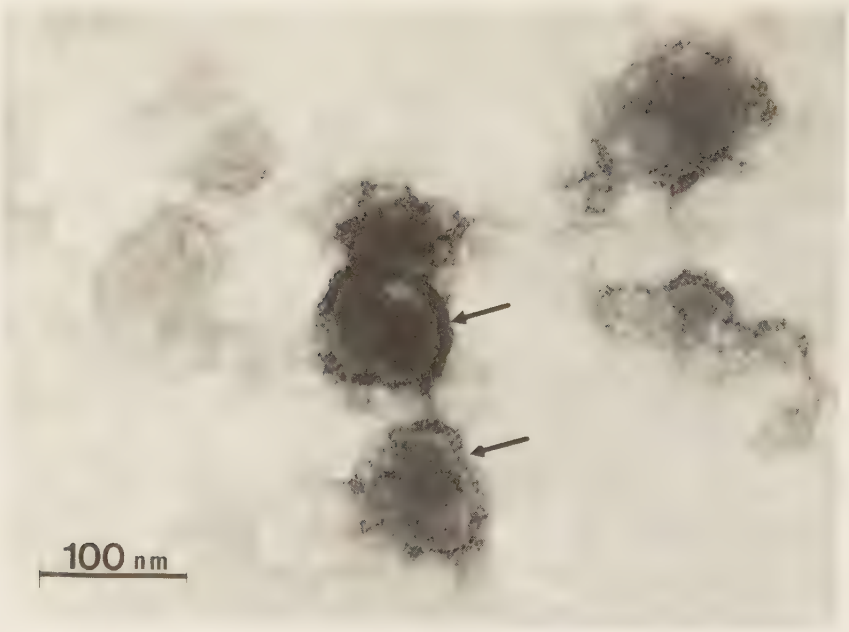

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3: NSD-Virionen aus der 87. SchN-Pge., St. 0 45, nach PEG-Präzipitation
Vergrößerung: 240.000 x
Mehrfach sind in dem Aggregat der äußere Projektionenbesatz, die sich anschließende elektronenoptisch leere membranartige Zone und granulierte oder streifige Innenstrukturen (Projektionenaufsicht) zu erkennen.

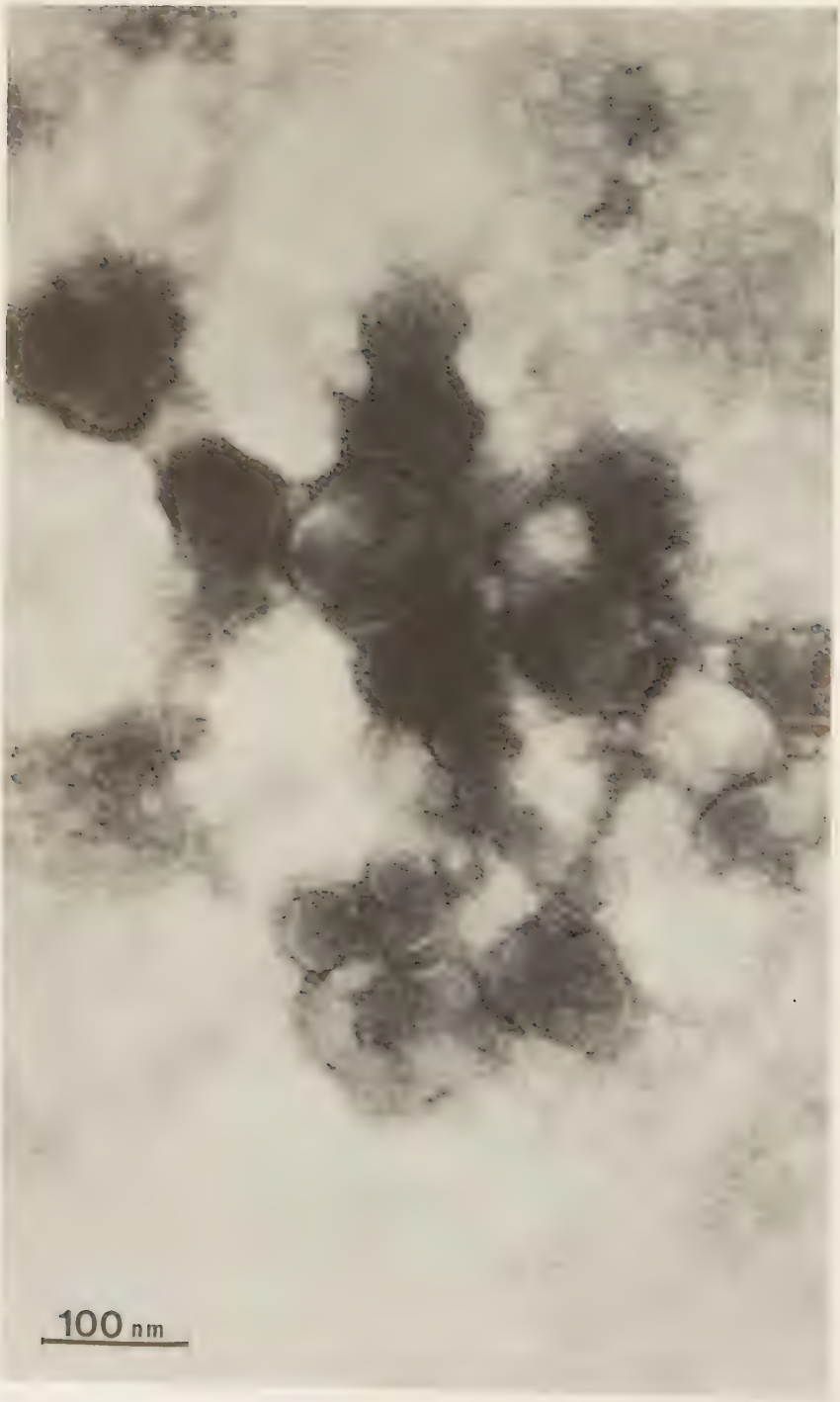

Abb. 3

Abb. 4: NSD-Virionen aus der 87. SchN-Pge., St. 0 45, nach PEG-Präzipitation
Vergrößerung: 300.000 x
Alle bisher beschriebenen Strukturcharakteristika sind deutlich dargestellt.

Abb. 5: NSDV der 90. SchN-Pge., St. I 105, nach PEG-Präzipitation
Vergrößerung: 240.000 x
Die Virionen sind teilweise von Begleitsubstanz bedeckt, manchenorts tritt ein zahnradartiger Besatz mit Projektionen hervor (➞).

Abb. 4

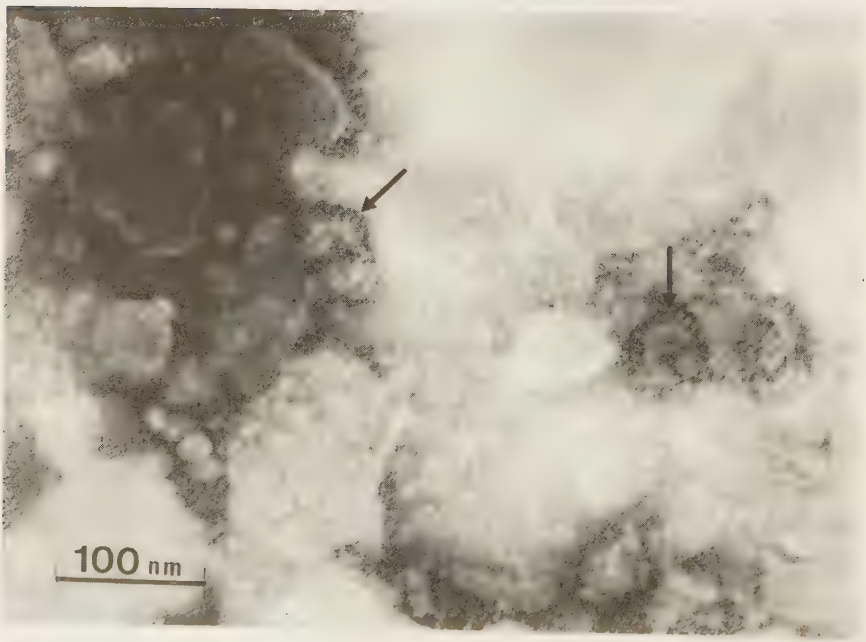

Abb. 5

Die Abbildungen 6 - 8 zeigen NSDV in Ultradünnschnitten einer infizierten SchN-Kultur (89. SchN-Pge., St. 0 45) am 3. Tag p.i..

Abb. 6: 2 NSDV-Partikel innerhalb einer intrazytoplasmatischen Vakuole. Der Projektionenbesatz ist nur angedeutet, die Membran jedoch klar erkennbar (➞).
Vergrößerung: 240.000 x

Abb. 7: Die im Zytoplasma liegenden NSD-Virionen weisen eine marmorierte Innenstruktur auf, die offensichtlich dem Anschnitt des Nukleokapsids entspricht.
Vergrößerung: 120.000 x

Abb. 6

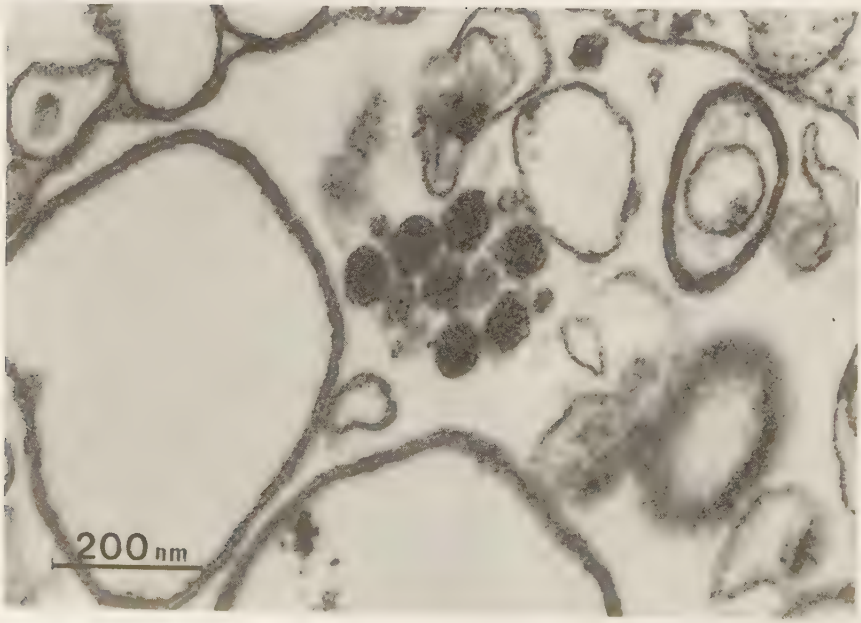

Abb. 7

Abb. 8: Ein äußerer, pelzartiger Projektionenbesatz der Virushülle ist erkennbar (➞).
Vergrößerung: 120.000 x

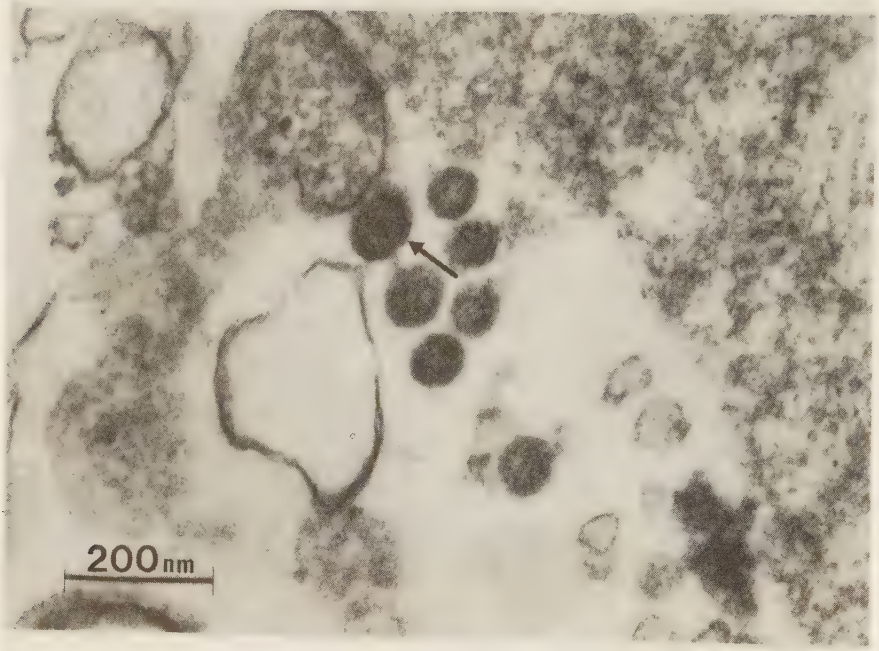

Abb. 8

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Nomenklatur und die Klassifizierung verschiedener Virusarten basieren zu einem großen Teil auf der Kenntnis und dem Vergleich ihrer morphologischen Eigenschaften. Von einem der tropenveterinärmedizinisch bedeutsamsten Arboviren, dem Nairobi Sheep Disease-Virus (NSDV), fehlen bisher Angaben über die Struktur freier, isolierter Virionen, so daß seine Zuordnung zu den bunyavirusähnlichen Viren vor allem auf bestimmten serologischen Beziehungen zu anderen Bunyaviren beruht. Einzelheiten über die Morphologie des Nairobi Sheep Disease-Virus waren bisher nur aus den Arbeiten von TERPSTRA (1969) und von MUNZ und GÖBEL (1977) bekannt. Diese Autoren berichteten jedoch lediglich über die Untersuchung von Ultradünnschnitten mit NSDV beimpfter BHK 21/13 - bzw. BHK 13 - Zellkulturen, wie auch ein Großteil der Erkenntnisse über die Struktur anderer Bunyaviren aus Beschreibungen der Virionen in derartigen Präparaten stammt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit geeigneten Methoden zur Anreicherung und Reinigung die elektronenmikroskopische Darstellung freier Partikel mit Hilfe des negative staining - Verfahrens zu ermöglichen, um anhand charakteristischer Struktureigenschaften die Natur des NSDV näher beschreiben zu können. Durch den Vergleich mit anderen Bunyaviren sollte dann versucht werden, die Zuordnung zu dieser Arbovirusgruppe auch vom morphologischen Gesichtspunkt aus zu bestätigen.

Als schnelles und einfaches Viruskonzentrierungsverfahren bot sich uns die Methode der direkten Anreicherung auf dem Objektträger mit der Airfuge-Ultrazentrifuge an, da durch die Konstruktionsprinzipien des Gerätes folgende Vorteile gegeben sind:

Die kleine Masse und die geringen Ausmaße des Rotorkopfes ermöglichen:

eine kurze Laufzeit bei höchsten Zentrifugalbeschleunigungen

die Verwendung kleiner Probenvolumina

eine einfache Handhabung

hohes Maß an Betriebssicherheit durch die geringe kinetische Energie des laufenden Rotors (max. 271 J)

die Adapter zur Objektträgerfixierung in den Zentrifugenröhrchen vereinfachen die Präparation von Virussuspensionen mit geringer Konzentration oder mit kleinem Volumen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung.

Bei der Sedimentierung auf dem Objektträger entfallen mehrere Präparationsschritte, die sonst zur Konzentrierung durch Gradientenzentrifugation oder Pelletierung von Probenmaterial nötig sind, wie z.B. wiederholte Ultrazentrifugation von Gradientenfraktionen, Resuspendierung der Viruspellets und anschließende Adsorption an die Objektträgernetzchen u.s.w.. Durch all diese Manipulationen sind die Viruspartikel einer Vielzahl von physikalischen und chemischen Einflüssen unterworfen. Da wir aus den Ergebnissen früherer Versuche (MUNZ, pers. Mitteilung) schlossen, daß es sich beim NSDV um ein besonders labiles Virion handelt, schien uns die Umgehung derartiger Störfaktoren durch die Methode der direkten Anreicherung erfolgversprechend.

Im Vergleich zu einer einfachen Konzentrierung von Virus-Zellkulturmaterial mit der Ultrazentrifuge L2-65B mit anschließender Objektträgeradsorption konnten tatsächlich mit dem Airfugeverfahren in kürzerer Zeit qualitativ bessere elektronenmikroskopische Präparate angefertigt werden: Die höhere Durchstrahlbarkeit war offenbar durch die gleichmäßigere Verteilung bedingt, die anscheinend aus der flächenhaften und nicht wie bei der Pelletierung auf einen Punkt gerichteten Sedimentierung unter der Einwirkung erheblicher Andruckkräfte resultierte.

Mit der Methode der direkten Anreicherung auf Objektträger mit der Airfuge-Ultrazentrifuge wurden NSDV-Partikel in den meisten Zellkulturpassagen, jedoch in unterschiedlicher, oft geringer Menge nachgewiesen. Die Titerberechnungen einiger Passagen ließen zum Teil für die einzelnen Passagen eine größere Anzahl von elektronenmikroskopisch nachweisbaren Partikeln erwarten, als wir tatsächlich feststellen konnten.

Die vergleichende Untersuchung von Suspensionen aus beimpften Zellkulturen vor und nach der Freisetzung von zellgebundenem Virus ergab, daß nach Zellzerstörung nie bedeutend mehr Partikel gefunden wurden als vorher im Überstand. Der Nachweis von zellgebundenem Virus in Ultradünnschnitten hätte dies jedoch erwarten lassen. Auch gelang die Darstellung von Strukturfeinheiten oft nicht in der gleichen Weise wie vor der Kältebehandlung. Eine Erklärung dafür bietet die Tatsache, daß es neben einer Viruskonzentrierung auch zu einer Zunahme von Begleitsubstanzen auf dem Objektträger kommt, wie sie in Zellkultursuspensionen auch nach Abzentrifugieren von Zelltrümmern noch vorhanden sind. Dadurch werden Viruspartikel häufig überlagert und elektronenoptisch nur schlecht dargestellt. Dies beobachteten wir wiederholt in Vorversuchen mit bekannten Virusarten. Es liegt auf der Hand, daß bei diesem Sachverhalt in Proben mit niedrigem Titer Viruspartikel nur schwer nachgewiesen werden können, insbesondere dann, wenn das Fehlen augenfälliger Struktureigenschaften das Auffinden erschwert.

Nach unserer Ansicht scheint auch die Labilität des NSDV-Partikels einen negativen Einfluß auf den Virusnachweis auszuüben. Wir fanden nach Sedimentation mit der Airfuge, daß es selbst nach kurzer Wirkungsdauer einer relativ hohen Zentrifugalbeschleunigung zu oft starken Deformierungen der Virionen kam.

Auch die Versuche der Gradientenzentrifugation deuten auf eine Labilität des Erregers besonders gegenüber physikalischen Einflüssen hin. Durch eine Polyäthylenglykol (PEG)-Präzipitation bereits konzentriertes Material, in dem schon vor der Zentrifugation der elektronenmikroskopische Virusnachweis mit der Adsorptionsmethode gelungen war, enthielt zwar Viruspartikel, jedoch stellten sie sich sehr stark deformiert, ohne erkennbare Feinstrukturen und nur in geringer Anzahl dar. Daß ein solches labiles Verhalten auch anderen Bunyaviren eigen ist, konnten ROBESON et al. (1979) am Beispiel des Karimabad-Virus zeigen, welches sich speziell gegenüber Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Hochgeschwindigkeitspelletierung als sehr empfindlich erwies.

Weitere Gründe dafür, daß der Virusnachweis nicht über alle Passagen möglich war, stellten unserer Ansicht nach verschiedene, nicht erklärbare Einflüsse während des negative staining und unregelmäßige Wechselwirkungen zwischen Objektträgeroberfläche und dem Objekt dar. So wurden bei Anwendung derselben Präparationstechnik, bei gleichem Material und derselben Probe unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Andererseits werden bei den Zellkulturpassagen offensichtlich Titer mit einem Maximalwert von ca. 5×10^6 LD_{50} / ml, wie auch frühere Versuche zeigten, erreicht. Jedoch treten daneben auch, abhängig vom Wirtszellsystem, Titer auf, die unterhalb der Nachweisgrenze der von uns angewandten Methoden zur elektronenoptischen Darstellung von NSDV-Partikeln zu liegen scheinen.

Das Auftreten und das Aussehen der Virusaggregate in den immunoelektronenmikroskopischen Präparaten deuteten darauf hin, daß eine spezifische Bindung von Antikörpern stattgefunden hatte. Dabei erschienen die teilweise dicht gepackten und meist stark

verformten Partikel wolkenartig von einer homogenen, elektronenoptisch dichten Substanz umgeben zu sein. Vermutlich könnte die Anwendung von Hyperimmunserum noch zu einer Verbesserung des quantitativen Virusnachweises führen.

Die PEG-Präzipitation erwies sich von allen Methoden in bezug auf die Abbildungsqualität als am besten geeignet. Eine geringere Deformierung der Partikel sowie die gute Darstellung von Struktureinzelheiten zeichneten diese Methode als ein schonendes Konzentrierungsverfahren aus. Besonders gut waren hier die randständigen Projektionen und das granuliert aussehende Partikelinnere erkennbar. Auch hier stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit denen von ROBESON et al. (1979) aus der Untersuchung des Karimabad-Virus.

Eine Glutaraldehyd (GAH) - Behandlung vor dem negative staining scheint keinen entscheidenden Stabilisationseffekt auf das NSDV auszuüben. Trotz des geringen Nachweises hatte es den Anschein, daß es nach GAH-Anwendung zu ähnlichen morphologischen Veränderungen des NSDV kam, wie sie BONSDORFF und PETTERSON (1975) für das Uukuniemivirion wie folgt feststellen konnten: Diese Partikel wiesen kaum mehr Deformationen auf, Oberflächenprojektionen erschienen regelmäßiger und verdeutlicht, und der Durchmesser der Uukuniemiviruspartikel war kleiner als im nicht fixierten Zustand (Abnahme von ca. 114 nm auf 92,4 nm). Derartige Einflüsse von Glutaraldehyd auf die Partikelmorphologie konnten auch bei unseren Untersuchungen beobachtet werden. Allerdings war eine Verdeutlichung der Projektionen nur am Partikelrand festzustellen. Der Durchmesser der Virionen verringerte sich besonders stark von 110 auf 60 nm.

Die Darstellung von NSDV in Ultradünnschnitten und in negative staining - Präparaten aus der gleichen Zellkulturpassage, die dem Vergleich von zellgebundenen und freien Virionen dienen sollte, ergab ein weitgehend übereinstimmendes Bild der verschieden behandelten Partikel. Die Unterschiede im mittleren Durchmesser und der äußeren Form sind offensichtlich durch die jeweiligen Präparationseinflüsse bedingte Phänomene, wie sie auch andere Untersucher von Bunyaviren beobachten konnten (DONETS et al., 1977; ELLIS et al., 1979; ROBESON et al., 1979). Die von uns in den Ultradünnschnitten gefundenen Virionen entsprachen weitgehend den Beschreibungen der runden Partikel, die von TERPSTRA (1969) sowie von MUNZ und GÖBEL (1977) in mit NSDV infizierten BHK-Zellkulturen nachgewiesen werden konnten. Ungeklärt bleiben muß jedoch die Frage nach der Bedeutung der von diesen Autoren dargestellten, bis zu 700 nm langen Gebilde, da wir ähnliche Formen in infizierten Schafnierenzellkulturen nicht vorfanden. Ob und zu welchem Zeitpunkt p.i. sie Ausdruck von Virusreplikationsvorgängen sind, müssen wir dahingestellt sein lassen.

Im Vergleich aller zur elektronenoptischen Darstellung verwendeten Methoden sei nochmals zusammenfassend festgestellt, daß mit der Airfuge-Ultrazentrifugation zwar in den meisten Fällen der Virusnachweis gelang, Strukturdetails aber vor allem mit Hilfe der PEG-Präzipitation sichtbar gemacht werden konnten. Dabei erwiesen sich Pioloform-befilmte Objektträger aufgrund ihrer Stabilität gegenüber der Zentrifugalkraft und Formvar-befilmte wegen der deutlichen Darstellung als günstig. Als bestes negative staining - Verfahren stellte sich die sog. "Kontrastierung von oben" heraus. Die Übereinstimmung des NSDV mit einem anderen Bunyavirus, dem Karimabad-Virus, im Verhalten gegenüber den Einflüssen der Saccharosedichtegradientenzentrifugation und der PEG-Präzipitation konnte durch unsere Versuche auch gezeigt werden.

Die morphologischen Charakteristika der Virionen, wie der offensichtlich sphärische Aufbau, der Partikeldurchmesser von ca. 110 nm (in Ultradünnschnitten 80 nm), der ca. 10 nm dicke pelz- oder borstenartig erscheinende Projektionenbesatz der Hülle sowie Lokalisation und Aussehen in der Wirtszelle sind Merkmale, die auch die meisten der bereits beschriebenen Bunyaviren aufweisen.

Dieses Bild des NSDV rechtfertigt somit auch aus morphologischer Sicht die Zuordnung des Erregers zu dieser Arbovirusgruppe.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Literaturteil der Arbeit umfaßt einen Überblick über die taxonomische Gliederung von Arboviren im allgemeinen sowie der Gruppe der Bunyaviren im speziellen. Dabei wird auf serologische Zusammenhänge, die u.a. die Zuordnung des Nairobi Sheep Disease - Virus (NSDV) zu den bunyavirusähnlichen Arboviren begründen, besonders jedoch auf die morphologischen Charakteristika bereits beschriebener Bunyaviren eingegangen.

Im experimentellen Teil folgt die Beschreibung der Züchtung des NSDV, verschiedener Virusanreicherungs- und/oder -reinigungsverfahren, sowie der Versuche zur elektronenmikroskopischen Darstellung negativ kontrastierter NSDV-Partikel und des Vergleiches mit ultrahistologisch untersuchten Virionen.

Der Virusnachweis gelang vielfach nach Aufzentrifugieren von Virussuspensionen auf Objektträger mit der Airfuge-Ultrazentrifuge. Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Pelletierung erwiesen sich als kaum geeignet.

Erfolge konnten auch mit immunoelektronenmikroskopischen Versuchen erzielt werden. Eine besonders gute Darstellung des NSDV war nach einer Polyäthylenglykol-Präzipitation möglich.

Die in Ultradünnschnitten von infizierten tertiären Schafnierenzellkulturen gefundenen Viruspartikel entsprachen in Lokalisation und Aussehen den bereits beschriebenen Bunyaviren und bis auf vermutlich präparationsbedingte, geringfügige Unterschiede in äußerer Form und Durchmesser auch morphologisch den freien, negativ kontrastierten NSDV-Partikeln.

Als Strukturcharakteristika des NSDV ergaben sich aus unseren Untersuchungen folgende Eigenschaften:

Partikelform: Sphärisch (rund bis leicht oval in Ultradünnschnitten - manchmal polymorph nach negative staining)

Größe (Mittelwerte): ca. 110 nm (nach negative staining)
ca. 80 nm (in Ultradünnschnitten)

Hülle: Mit ca. 10 nm breitem Besatz aus feinborstenartigen Projektionen, darunter ca. 5 nm dicke, elektronenoptisch leere Schicht

Partikelzentrum: Feingekörnte, granulierte Strukturen (negative staining) bzw. unregelmäßige, amorphe Massen (Ultradünnschnitte)

Diese Ergebnisse rechtfertigen die Einordnung des Nairobi Sheep Disease - Virus in die Gruppe der bunyavirusähnlichen Arboviren auch aus morphologischen Gründen.

Ch. Krolopp

Investigations on the electron-microscopical description of Nairobi Sheep Disease - Virus

SUMMARY

The first part of this thesis gives a comprehensive view of the taxonomy of arboviruses and in particular, bunyaviruses. Serological relationships, justifying the integration of the Nairobi Sheep Disease - Virus (NSDV) into the group of bunyavirus-like viruses, as well as the morphological characteristics of these viruses, are shown.

The second part describes the growth of NSDV, various methods of virus concentration and purification, experiments on the detection of negative stained NSDV-particles under the electron-microscope and the comparison with virions found in ultrathin sections of tissue cultures.

The detection of the virus was in many cases obtained after having sedimented virus suspension on electron-microscope-grids in the Airfuge-ultracentrifuge. Sucrose gradient centrifugation and pelleting were found to be ineffective.

Good results were achieved with immune-electron-microscopical experiments. A very good method used in order to describe the morphological characteristics of NSDV was the polyethylene glycol precipitation.

Those virus particles, found in infected ultrathin sections of tertiary sheep kidney cell cultures were, with regard to localization and appearance, equivalent to the bunyaviruses and to the

morphology of negative stained NSDV-particles; except for slight variations in form and diameter, which were probably due to the method of preparation.

As a result of our experiments the morphological characteristics of the NSDV are shown as follows:

shape: spherical (round, slightly oval in ultrathin sections - occasionally pleomorphic, after negative staining)
size (average diameter): 110 nm (after negative staining)
80 nm (in ultrathin sections)
envelope: consists of a 5 nm wide, electron-transparent layer, covered with about 10 nm long, bristle-like projections
inner structures of the particles: fine granulated (negative staining) or irregular, amorphous material (ultrathin sections)

These results justify the integration of the NSDV into the group of the bunyavirus-like arboviruses when seen from the morphological point of view.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANSELL, R.H.
Attenuation of Nairobi Sheep Disease Virus in the mouse brain.
Vet.Rec. 69,410, 1957

BERGE, T.O., SHOPE, R.E., WORK, T.H.
The Subcommittee on Information Exchange of the American Committe on Arthropod-borne viruses. Catalogue of Arthropod-borne viruses of the world.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 19, 1079, 1970

BERGE, T.O.
International Catalogue of Arboviruses Including Certain other Viruses of Vertebrates.
DHEW Publication No. 75-8301, Washington C.C., 1975

BERGOLD, G.H., MARQUIEZ, L.A.G., MAZZALI, R., MUNZ, K.
Structure of 9 Arboviruses.
J. gen. Virol. 5, 135, 1969

BISHOP, D.L., SHOPE, R.E.
Bunyaviridae.
Comprehensive Virology 14,1, 1979

v. BONSDORFF, C.-H., PETTERSON, R.
Surface structure of Uukuniemi-Virus.
J. Virol. 16, 1296, 1975

BOSHNELL, J., DESAI, P.K., DANDAWATE, C.N., GOVERDHAN, M.K.
Isolation of Ganjam Virus from ticks Haemaphysalis intermedia.
Indian J. Med. Res. 58, 561, 1970

CASALS, J.
Filtration of arboviruses through "Millipore" membranes.
Nature (London) 217, 648, 1968

KEROLEV, M.B., DONETS, M.A., RUBIN, S.G., CHUMAKOV, M.P.
Morphology and Morphogenesis of Crimean Hemorrhagic Fever Virus.
Arch. Virol. 50, 169, 1976

KIRYA, G.B., TUKEI, P.M., LULE, M., MUJOMBA, E.
Parasitosis of man and animals Africa. NSD in man.
Proceedings of the 1972 Annual Scientific Conference of the East African Med. Res. Council, Dar es Salaam, Chapter 7, Paper 6, 1972

KURSTAK, E., KURSTAK, C.
Comparative diagnosis of viral diseases I. Human an related viruses, Part A.
Academic Press Inc., NY., 1977

LEWIS, E.A.
Nairobi Sheep Disease.
Annu.Rep. Dep. Vet. Serv., Kenya 1947, 51, 1949

MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B., WITTMANN, G.
Virologische Arbeitsmethoden,Band II.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1977

MATTHEWS, R.E.F.
International Committe on Taxonomy of Viruses Classification and Nomenclature of viruses.
Report prepared by the International Committe on Taxonomy of Viruses and published for the Virology Section of the International Association of Microbiological Societies (IAMS).
S. Karger Verlag, Basel, New York, 1979

MELNICK, J.L.
Taxonomy of Viruses 1979
Prog. med. Virol. 25, 160, 1979

MONTGOMERY, R.E.

On a tick-borne gastro-enteritis of sheep and goats occurring in British East Africa.

J. Comp. Pathol. Ther. 30, 28, 1917

MÜLLER, G.

Negativkontrastierung von Viren In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Hrsg.: Schimmel, G., Vogell, W.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart, 1975

MÜLLER, G., NIELSEN, G., BAIGENT, C.L.

Electron microscopical particle counting in virology II. Parameters governing the efficiency of sedimentation techniques and its improvement with the application of Poly-L-Lysine

Arch. Virol. 64, 311, 1980

MUNDERLOH, U.

Die Nairobi Sheep Disease - eine synoptische Darstellung der Erkrankung sowie Untersuchungen zum Verhalten des Erregers in vitro und in vivo.

Vet. med. Diss., Universität München, 1977

MUNZ, E., GÖBEL, E.

In vivo und in vitro Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des Virus der Nairobi Sheep Disease.

Tagung deutschsprach. Tropenmed. Ges., Lindau, 1977

MURPHY, F.A., HARRISON, A.K., WHITFIELD, S.G.

Bunyaviridae: Morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses.

Intervirology 1, 297, 1973

PORTERFIELD, J.S.

Structure and classification of arboviruses.

Med. Biol. 53, 400, 1975

CASALS, J.

Crimean-Congo hemorrhagic fever, in: Proceedings of the International Colloquium on Ebola-virus Infection and other Hemorrhagic Fevers (S.R. Pattyn, ed.).

Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, 1978

CASALS, J.
WHITMAN, L.

Group C, a new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses. Immunological studies.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 10, 250, 1961

CAUSEY, O.R.,
KEMP, G.E., CASALS, J.,
WILLIAMS, R.W.,
MADBOULY, M.H.

Dugbe virus, a new arbovirus from Nigeria

Niger. J. Sci. 5, 41, 1971

CONVERSE, J.D.,
HOOGSTRAAL, H.,
MOUSSA, M.I., BAFORT, J.M.

Isolation of Dugbe virus from Amblyomma variegatum ticks in Cameroun.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68, 411, 1974

DANDAWATE, L.N.,
SHAH, K.V.

Ganjam virus: A new arbovirus isolated from ticks Haemaphysalis intermedia Warburton and Nuttall, 1909 in Irissa, India.

Indian J. Med. Res. 57, 799, 1969

DAUBNEY, R.,
HUDSON, J.R.

Nairobi Sheep Disease

Parasitology 23, 507, 1931

DAUBNEY, R.,
HUDSON, J.R.

Nairobi Sheep Disease: Natural and experimental transmission by ticks other than Rhipicephalus appendiculatus.

Parasitology 26, 496, 1934

DAVID-WEST, T.S., PORTERFIELD, J.S. Dugbe Virus: A tick-borne Arbovirus from Nigeria.
J. gen. Virol. 23, 297, 1974

DAVIES, F.G. East African Virus Res. Org., Muguga, Kenya.
Ann. Rep. 15, 1972

DONETS, M.A., CHUMAKOV, M.P., KOROLEV, M.B., RUBIN, S.G. Physio chemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean Hemorrhagic Fever.
Intervirology 8, 294, 1977

EDELSTEIN, R.M. The distribution and prevalence of Nairobi Sheep Disease and other tick-borne infections of sheep and goats in Northern Somalia.
Trop. Anim. Hlth. Prod. 7, 29, 1975

ELLIS, D.S., SIMPSON, D.I.H., STAMFORD, S.K., KOUKA, S.E.A.W. Rift Valley Fever Virus: Some ultra-structural observations on material from the outbreak in Egypt 1977.
J. gen. Virol. 42, 329, 1979

KÄRBER, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn Schmiedbergs Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480, 1931

KEMP, G.E., CAUSEY, O.R., CAUSEY, C.E. Virus isolations from trade cattle, sheep, goats, swine at Ibadan, Nigeria.
Bull. Epizoot. Dis. Afr. 19, 131, 1971

PORTERFIELD, J.S.,
CASALS, J.,
CHUMAKOV, M.P.,
GAIDAMOVICH, S.Y.,
HANNOUN, C., HOLMES, I.,
HORZINEK, M.C.,
MUSSGAY, M.,
OKERK-BLOM, N., RUSSEL, P.K. Bunyaviruses and Bunyaviridae.

Intervirology 6, 13, 1975/76

RAJAGOPALAN, P.K.,
SREENIVASAN, M.A.,
SHARDA, D.P. Isolation of Ganjam virus from the bird tick Haemaphysalis wellingtoni Nuttal and Warburton 1907

Indian J. Med. Res. 58, 1195, 1970

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electr. micr.

J. Cell. Biol. 17, 208, 1963

ROBESON, G., EL SAID, L.H.,
BRANDT, W., DALRYMPLE, J.,
BISHOP, D.H.L. Biochemical studies on the Phlebotomus Fever Group Viruses (Bunyaviridae Family)

J. Virol. 30, 339, 1979

SMOCK, J.W., BELLIS, J. Rotors and tubes for preparative ultrazentrifuges.

Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California 94304, 1972

TERPSTRA, C. Nairobi Sheep Disease - Studies on virus properties, epizootology and vaccination in Uganda.

Diss., Universität Utrecht, 1969

WEINBREN, M.P.,
GOURLAY, R.N.,
LUMSDEN, W.H.R,
WEINBREN, B.M. An epizootic of Nairobi Sheep Disease in Uganda.

J. Comp. Path. 68, 174, 1958

7. LEBENSLAUF

Am 20.6.1954 wurde ich in München als Sohn von Kurt Krolopp und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Schauer, geboren.

Nach 6-jähriger Volksschulzeit (1960 - 1966) besuchte ich die Städt. Carl von Linde - Realschule, München, an der ich 1970 die Prüfung zur mittleren Reife ablegte. Im selben Jahr trat ich ins Wittelsbacher - Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) der Stadt München über, an dem ich im Juni 1973 das Reifezeugnis erhielt.

Meinen Grundwehrdienst leistete ich vom Juli 1973 bis zum September 1974 ab.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich in München das Studium der Tiermedizin, das ich im Dezember 1979 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 12.2.1980.

In der Zeit vom Februar bis November 1980 fertigte ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München vorliegende Dissertation an.

Bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch bedanke ich mich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Für die Übergabe des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. E. Munz.

Herrn Dr. E. Göbel danke ich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn M. Reimann für alle Ratschläge, seine große Hilfsbereitschaft und Geduld.